



SELMA -
das ERAD-ähnliche Präproteintranslokationssystem
der zweiten Plastidenmembran von
Phaeodactylum tricornutum

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Franziska Hempel
aus Frankfurt am Main

Marburg/Lahn 2009

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Andreas Brune

Prof. Dr. Ralf Jacob

Tag der Disputation am:

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Hempel F, Bullmann L, Lau J, Zauner S, Maier UG (2009) ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Biol Evol* 26(8): 1781-1790

Weitere Publikationen:

Felsner G, Sommer MS, Gruenheit N, **Hempel F**, Moog D, Zauner S, Martin W, Maier UG (2009) ERAD components in chromists suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane in secondary symbioses involving different hosts. *Eucaryot Cell*, submitted

Bullmann L, Haar R, Mirus O, Bredemeier R, **Hempel F**, Maier UG, Schleiff E (2009) Filling the gap: the evolutionary conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem*, submitted

Gruber A, Vugrinec S, **Hempel F**, Gould SB, Maier UG, Kroth PG (2007) Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Mol Biol* 64(5):519-30

Gould SB, Fan E, **Hempel F**, Maier UG, Klösken RB (2007) Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *J Biol Chem* 282(41):30295-302

Übersichtsartikel, Buchbeiträge:

Bolte K, Bullmann L, **Hempel F**, Bozarth A, Zauner S, Maier UG (2009) Protein targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol* 56(1):9-15

Hempel F, Bozarth A, Sommer MS, Zauner S, Przyborski JM, Maier UG (2007) Transport of nuclear-encoded proteins into secondarily evolved plastids. *Biol Chem* 388(9):899-906

Hempel F (2009) Proteintransport in komplexe Plastiden. *BIOspektrum*, 15(1):98-99

Inhaltsverzeichnis

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

II. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE EVOLUTION PHOTOTROPHER EUKARYOTEN	1
1.1.1	Die Evolution primärer Plastiden.....	1
1.1.2	Die Evolution sekundärer Plastiden	2
1.1.3	Die Chromalveolaten-Hypothese	5
1.2	PROTEINTRANSPORT IN PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE PLASTIDEN.....	6
1.2.1	Proteintransport in primäre Plastiden	7
1.2.2	Proteintransport in sekundäre Plastiden	8
1.2.3	Proteintransport in die komplexe Plastide von <i>P. tricornutum</i> im Speziellen	12
1.3	DAS ERAD-TRANSLOKATIONSSYSTEM.....	16
1.3.1	ER-assoziierte Degradation (ERAD)	16
1.3.1.1	Substraterkennung im ER	16
1.3.1.2	Retrotranslokation.....	17
1.3.1.3	Proteasomale Degradation.....	21
1.3.2	Symbiontenspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten.....	22
1.4	ZIELSETZUNG	24
2	ERGEBNISSE.....	25
2.1	DER SYMBIONTENSPEZIFISCHE DER1-KOMPLEX VON <i>P. TRICORNUTUM</i>	25
2.1.1	Die symbiontenspezifischen Proteine sDer1-1 und sDer1-2.....	26
2.1.2	sDer1-Proteine sind integrale Membranproteine der PPM.....	27
2.1.3	sDer1-1 und sDer1-2 bilden einen oligomeren Komplex in der PPM	32
2.1.4	Der sDer1-Komplex interagiert mit Transitpeptiden periplastidärer Proteine	36
2.1.5	Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine am sDer1-Komplex	39
2.2	DIE SYMBIONTENSPEZIFISCHE UBIQUITIN-LIGASE S-E3 VON <i>P. TRICORNUTUM</i>	41
2.2.1	Data-Mining: Kandidaten für eine symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase	41
2.2.2	Das Protein s-E3.....	42
2.2.3	s-E3 ist ein symbiontenspezifisches Membranprotein mit katalytischer Funktion im PPC	43
2.2.4	s-E3 ist eine funktionelle RING-Finger Ubiquitin-Ligase.....	47
2.2.5	s-E3-Kandidaten in anderen Chromalveolaten	48

3	DISKUSSION	51
3.1	SELMA: EIN VOM ERAD-SYSTEM ABGELEITETER PRÄPROTEIN-TRANSLOKATOR.....	52
3.1.1	Ein relokalisiertes Transportsystem	52
3.1.2	Der sDer1-Komplex als Translokationskanal ?	53
3.1.3	Aromatisch oder nicht aromatisch - Unterscheidung am sDer1-Komplex .	56
3.1.4	s-E3 und SELMA	60
3.1.5	Modell zur SELMA-vermittelten Präproteintranslokation	63
3.2	EVOLUTION DES SELMA-SYSTEMS.....	67
3.3	SELMA UND DIE CHROMALVEOLATEN-HYPOTHESE	70
3.4	AUS ALT MACH' NEU: RECYCLING ALS EVOLUTIONSPRINZIP.....	74
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
5	MATERIAL UND METHODEN	78
5.1	MATERIAL	78
5.1.1	Chemikalien	78
5.1.2	Geräte	78
5.1.3	Membranen, Filter und Photomaterialien	79
5.1.4	Software- und Internetanwendungen.....	79
5.1.5	Puffer und Lösungen.....	80
5.1.6	Molekularbiologische Kits	80
5.1.7	Enzyme.....	81
5.1.8	Längen- und Molekulargewichtstandards.....	81
5.1.9	Oligonukleotide	81
5.1.10	Vektoren	83
5.1.11	Antikörper.....	83
5.1.12	Organismen	83
5.2	METHODEN	84
5.2.1	Kultivierung der Organismen.....	84
5.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung der Diatomee <i>P. tricornutum</i>	84
5.2.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	84
5.2.2	Nukleinsäure-Analytik	85
5.2.2.1	DNA- und RNA-Isolierung aus <i>P. tricornutum</i>	85
5.2.2.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	85
5.2.2.3	Amplifikation von Nukleinsäuren	85
5.2.2.4	Reverse Transkription.....	85
5.2.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	86
5.2.2.6	Restriktion von DNA	86
5.2.2.7	Ligation von DNA Fragmenten	86
5.2.2.8	Sequenzierung von DNA.....	86
5.2.2.9	Transformation der <i>E. coli</i> Stämme TOP10 und BL21	87
5.2.2.10	Transfektion von <i>P. tricornutum</i>	88
5.2.3	Protein-Analytik.....	89
5.2.3.1	Herstellung von <i>P. tricornutum</i> Proteinextrakt.....	89

5.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	90
5.2.3.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	90
5.2.3.4	Semidry Westernblot und Immunodetektion	90
5.2.3.5	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	91
5.2.3.6	Carbonatextraktion	91
5.2.3.7	Co-Immunopräzipitation von Proteinen aus <i>P. tricornutum</i>	92
5.2.4	<i>In vivo</i> Lokalisationsstudien in <i>P. tricornutum</i>	93
5.2.5	<i>In vivo</i> Analysen zur Topologie von Membranproteinen mittels Self-assembling GFP	93
5.2.6	<i>In vivo</i> Proteininteraktionsstudien mittels Split-GFP	95
5.2.7	<i>In vitro</i> Ubiquitinierungs-Analysen	96
5.2.8	<i>In silico</i> Analysen von Zielsteuerungssequenzen	96
5.2.9	Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie	97
LITERATURVERZEICHNIS		98
ANHANG		110
A	Alignments.....	110
B	Proteinidentifikationsnummern und Zielsteuerungssequenzen.....	112
C	Kontrollexperimente zum Split- und Self-assembling GFP-System.....	113
D	Tabelle der in Chromalveolaten identifizierten ERAD-Faktoren	114
E	Vektorkarten.....	115
DANKSAGUNG		
CURRICULUM VITAE		
ERKLÄRUNG		

I. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure	TIC	<i>Translocon of the inner chloroplast membrane</i>
AK	Antikörper	TOC	<i>Translocon of the outer chloroplast membrane</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>	TP	Transitpeptid
Bp	<i>Base pairs, Basenpaare</i>	U	Unit
BTS	<i>Bipartite topogenic signal</i>	üN	über Nacht
cER	<i>Chloroplast ER</i>	WB	Westernblot
d	<i>Day, Tag</i>	WT	Wildtyp
ddH ₂ O	Wasser, doppelt destilliert	v/v	Volume per volume
DIC	<i>Differential interference contrast</i>	w/v	Weight per volume
Der	<i>Degradation at the ER</i>	w/w	Weight per weight
Derlin	<i>Der1 like protein</i>		
DNA	Desoxyribonukeinsäure		
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat		
eGFP	<i>Enhanced green fluorescen protein</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EM	Elektronenmikroskop		
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>		
h	<i>Hour(s), Stunden</i>		
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>		
IMS	<i>Intermembrane space</i>		
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid		
kDa	Kilo Dalton		
Ko	Kontrolle		
KLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop		
min	Minuten		
Nm	Nukleomorph		
OD	Optische Dichte		
PAF	Plastidenautofluoreszenz		
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese		
PBS	<i>Phosphat bufferd saline</i>		
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail		
PDI	Protein Disulfid-Isomerase		
PPC	Periplastidäres Kompartiment		
PPM	Periplastidäre Membran		
RING	<i>Really interesting new gene</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SA-GFP	Self-assembling GFP		
SELMA	<i>Symbiont-specific ERAD-like machinery</i>		
SP	Signalpeptid		
TBS	<i>Tris buffered saline</i>		
TCA	Trichloressigsäure		

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1-1: Schematische Darstellung zur Entstehung primärer Plastiden.	2
Abb. 1-2: Schematische Darstellung zur Entstehung sekundärer Plastiden.	4
Abb. 1-3: Schematische Darstellung zum Präproteintransport in primäre und sekundäre Plastiden.	11
Abb. 1-4: Schematische Darstellung zum Präproteintransport in die komplexe Plastide der Diatomee <i>P. tricornutum</i> .	15
Abb. 1-5: Schematische Darstellung zur ER-assoziierten Degradation eines Substrats mit lumenaler Läsion (ERAD-L) in <i>S. cerevisiae</i> .	21
Abb. 1-6: Schematische Darstellung des wirts- und symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates verschiedener Chromalvolaten.	23
Abb. 2-1: Vergleichende Darstellung von Der1p aus <i>S. cerevisiae</i> und wirts- sowie symbiontenspezifischen Der1-Proteinen aus <i>P. tricornutum</i> .	27
Abb. 2-2: Untersuchungen zur Lokalisation der symbiontenspezifischen Proteine sDer1-1 und sDer1-2 in <i>P. tricornutum</i> .	29
Abb. 2-3: Untersuchungen zur Lokalisation und Topologie von sDer1-1 und sDer1-2 mit Hilfe des Self-assembling GFP-Systems in <i>P. tricornutum</i> .	31
Abb. 2-4: <i>In vitro</i> Analysen zur Oligomerisierung der Proteine sDer1-1 und sDer1-2.	33
Abb. 2-5: <i>In vivo</i> Analysen zur Oligomerisierung der Proteine sDer1-1 und sDer1-2 in <i>P. tricornutum</i> .	35
Abb. 2-6: sDer1-1 und sDer1-2 interagieren mit den Transitpeptiden periplastidärer nicht aber stromaler Proteine.	38
Abb. 2-7: Die +1 Position des Transitpeptids ist kritisch für die Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine am sDer1-Komplex in <i>P. tricornutum</i> .	40
Abb. 2-8: Schematische Darstellung von Hrd1p aus <i>S. cerevisiae</i> , dem wirtsspezifischen Hrd1-Protein aus <i>P. tricornutum</i> und der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3.	43
Abb. 2-9: Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins s-E3 in <i>P. tricornutum</i> .	44
Abb. 2-10: <i>In vivo</i> Untersuchungen zur Topologie und Lokalisation von s-E3 in <i>P. tricornutum</i> .	46
Abb. 2-11: Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsaktivität von s-E3 und der RING-H2-Domäne im Speziellen.	48
Abb. 2-12: Vergleichende Darstellung wirtsspezifischer Hrd1-Proteine und der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligasen s-E3 aus <i>P. tricornutum</i> und <i>T. pseudonana</i> .	50

Abb. 3-1: Modell zur Unterscheidung periplastidärer und stromaler Präproteine am sDer1-Komplex der zweiten Plastidenmembran von <i>P. tricornutum</i> .	59
Abb. 3-2: Modell zur SELMA-vermittelten Präproteintranslokation in <i>P. tricornutum</i> im Vergleich zum genuinen ERAD-L System aus <i>S. cerevisiae</i> .	66
Abb. 3-3: Das SELMA-System als phylogenetischer Marker - Modelle für die Evolution der Chromalveolaten.	73
Abb. A-1: Alignment der Aminosäuresequenzen von Der1p aus <i>S. cerevisiae</i> und wirts- sowie symbiontenspezifischen Der1-Proteinen aus <i>P. tricornutum</i> .	110
Abb. A-2: Alignment der Aminosäuresequenzen der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3 aus <i>P. tricornutum</i> (Pt_s-E3) und dem s-E3-Homolog aus <i>T. pseudonana</i> (Tp_s-E3).	111
Abb. A-3: Zielsteuerungssequenzen verschiedener in dieser Arbeit untersuchten Proteine aus <i>P. tricornutum</i> .	112
Abb. A-4: Kontrollexperimente zum Split-GFP Interaktionssystem in <i>P. tricornutum</i> .	113
Abb. A-5: Kontrollexperimente zum Self-assembling GFP-System in <i>P. tricornutum</i> .	113
Abb. A-6: Vektorkarte pPha-DUAL[2xNR].	115
 Tab. A-1: Wirts- und symbiontenspezifische ERAD-Faktoren, die in den Genomen verschiedener Chromalveolaten identifiziert wurden.	 114

1 Einleitung

1.1 Die Evolution phototropher Eukaryoten

Die oxigene Photosynthese, d.h. die durch Lichtenergie angetriebene Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser zu Sauerstoff und energiereichen Kohlenstoffverbindungen, wurde vor ca. 3.5 Milliarden Jahren in den Vorfahren heutiger Cyanobakterien entwickelt und schuf die Grundlage für das heutige Leben (Schopf, 1993). Erst ca. 2 Milliarden Jahre später entstanden eukaryote Zellen, die zur phototrophen Lebensweise fähig waren (Yoon et al, 2004). Diese frühen phototrophen Eukaryoten haben die Photosynthese jedoch nicht neu erfunden, sondern ein ancestrales Cyanobakterium phagozytiert, als Endosymbionten stabil integriert und schließlich zum photosynthetischen Organell, der primären Plastide, reduziert. Dieser Prozess ist heute unter dem Begriff primäre Endosymbiose bekannt (Margulis, 1970; Mereschkowsky, 1905) und führte zur initialen Verbreitung der photoautotrophen Lebensweise im Reich der Eukaryoten (McFadden, 2001; Stoebe & Maier, 2002). Darauf folgende sekundäre und tertiäre Endosymbiosen führten zur Entstehung neuer phototropher eukaryoter Linien, die heute einen Hauptbestandteil des marinen Phytoplanktons bilden und einen erheblichen Beitrag zur globalen Kohlenstofffixierung leisten (Gould et al, 2008). Im Folgenden wird eine Übersicht zur Evolution primärer und sekundärer Plastiden gegeben.

1.1.1 Die Evolution primärer Plastiden

Im Rahmen einer primären Endosymbiose, der Aufnahme und stabilen Integration eines ehemals frei lebenden Cyanobakteriums durch eine heterotrophe eukaryote Wirtszelle, sind die Rodophyta, Chlorophyta (und die daraus hervorgegangenen Landpflanzen) und Glaucophyta entstanden (Abb. 1-1). Diese werden heute vielfach als Archaeplastida zusammengefasst (Adl et al, 2005). Alle drei Linien besitzen so genannte primäre Plastiden, die von zwei Hüllmembranen, dem *plastid envelope*, umgeben sind. Im Laufe der Evolution wurde der cyanobakterielle Endosymbiont stark reduziert, und ein Großteil der symbiontenspezifischen Gene wurde in den Nukleus der Wirtszelle transferiert oder

ging verloren (Martin, 2003; Martin et al, 1998; Timmis et al, 2004). So kodieren heutige Plastidengenome nur noch für ca. 1 - 3 % rezenter cyanobakterieller Genome. Die Mehrheit der plastidären Proteine ist im Nukleus der Wirtszelle kodiert und wird durch speziell dafür entwickelte Präproteintranslokatoren zurück in die Plastide transportiert (Soll & Schleiff, 2004). Die Reduktion des Endosymbionten bis hin zum semiautonomen Organell ist folglich mit komplexen Umstrukturierungen verbunden, und phylogenetische Analysen zeigen, dass diese Entwicklung im Falle der Archaeplastida vermutlich nur einmal stattgefunden hat. Rodophyten, Chlorophyten und Glaucophyten haben somit einen monophyletischen Ursprung (Martin et al, 2002; Rodriguez-Ezpeleta et al, 2005; Yoon et al, 2004).

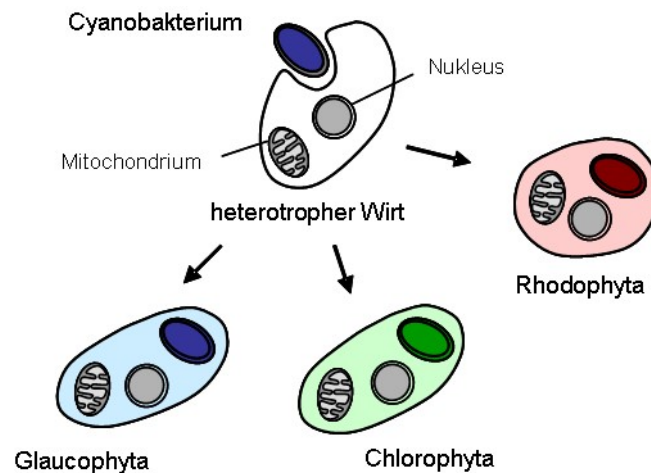


Abb. 1-1: Schematische Darstellung zur Entstehung primärer Plastiden. Die Plastiden der Rodophyten (Rotalgen), Chlorophyten (Grünalgen) und Glaucophyten sind im Rahmen einer primären Endosymbiose entstanden. Ein ancestrales Cyanobakterium wurde von einer heterotrophen eukaryoten Wirtszelle aufgenommen und im Laufe der Evolution zum photosynthetischen Organell, der primären Plastide, reduziert (modifizierte Abbildung nach Hjorth et al, 2004).

1.1.2 Die Evolution sekundärer Plastiden

Verschiedene Algengruppen, aber auch humanpathogene Parasiten, wie der Malaria Erreger *Plasmodium falciparum*, besitzen Plastiden, die nicht nur von zwei, sondern von drei bzw. vier Membranen umgeben sind. Diese so genannten komplexen oder sekundären Plastiden sind im Rahmen von sekundären Endosymbiosen entstanden, bei

denen eine phototrophe eukaryote Zelle erneut von einer eukaryoten Zelle aufgenommen und als Organell etabliert wurde (Cavalier-Smith, 2003; Hjorth et al, 2004; Stoebe & Maier, 2002). Belege dafür finden sich bei den Cryptophyten und den Chlorarachniophyten, die ein evolutionäres Zwischenstadium abbilden und zwischen den Membranen zwei und drei noch den Zellkern des Endosymbionten als reduziertes Nukleomorph erhalten haben (Greenwood et al, 1977; Hibberd & Norris, 1984). Die Entstehung dieser eukaryoten Chimären, so genannter Meta-Algen, wird auf ca. 550 Millionen Jahre zurückdatiert (Cavalier-Smith, 2003) und hat im Gegensatz zur primären Endosymbiose in jedem Fall mehrfach – mindestens dreimal – stattgefunden. So wurde zweimal unabhängig eine Grünalge als Endosymbiont aufgenommen und zum Organell reduziert, wodurch die Euglenophyten und die Chlorarachniophyten entstanden sind (Rogers et al, 2007; Takahashi et al, 2007) (Abb. 1-2, A). Mindestens einmal wurde eine Rotalge als Symbiont etabliert. In dieser roten Linie werden gemäß der Chromalveolaten-Hypothese die Heterokontophyten, Haptophyten und Cryptophyten (Chromisten) sowie die Apikomplexen, Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Ciliaten (Alveolaten) zusammengefasst (Cavalier-Smith, 1999) (Abb. 1-2, B). Die Monophylie der Chromalveolaten wird unter Berücksichtigung aktueller phylogenetischer Daten allerdings zunehmend kontrovers diskutiert (Archibald, 2009; Keeling, 2009). Verschiedene Aspekte dieser Diskussion werden in Abschnitt 1.1.3 beschrieben.

Im Fall der Apikomplexen wurde die sekundäre Plastide zu einem nicht-photosynthetischen minimalen Organell, dem Apikoplast, reduziert (Waller & McFadden, 2005). Verschiedene Organismen haben die Plastide jedoch möglicherweise vollkommen eliminiert und sind zur heterotrophen Lebensweise zurückgekehrt. Beispiele hierfür bilden die Ciliaten und die Oomyceten (plastidenlose Heterokontophyten). Beide Gruppen besitzen keine Plastide, kodieren im Genom jedoch verschiedene Gene, die plastidären Ursprungs sind (Reyes-Prieto et al, 2008; Tyler et al, 2006). Phylogenetische Analysen zeigen eine Verwandtschaft zu den Chromalveolaten auf und legen damit nahe, dass das Organell im Laufe der Evolution möglicherweise mehrfach unabhängig eliminiert wurde (Archibald, 2008; Cavalier-Smith, 2002; Okamoto et al, 2009).

Eine weitere Stufe der Endosymbiose stellt die so genannte tertiäre Endosymbiose dar, wie sie bei einigen Dinoflagellaten stattgefunden hat. In diesen Fällen wurden Diatomeen,

Haptophyten, Cryptophyten oder auch Chlorarachniophyten, die einer sekundären Endosymbiose entstammen, erneut von phagotrophen Wirtszellen aufgenommen und als Symbiont etabliert (Hackett et al, 2004; Hjorth et al, 2004). In den meisten Fällen besaßen diese Wirtszelle bereits zuvor sekundäre Plastiden, die im Zuge der tertiären Endosymbiose eliminiert bzw. ersetzt wurden (Ishida & Green, 2002; Patron et al, 2006).

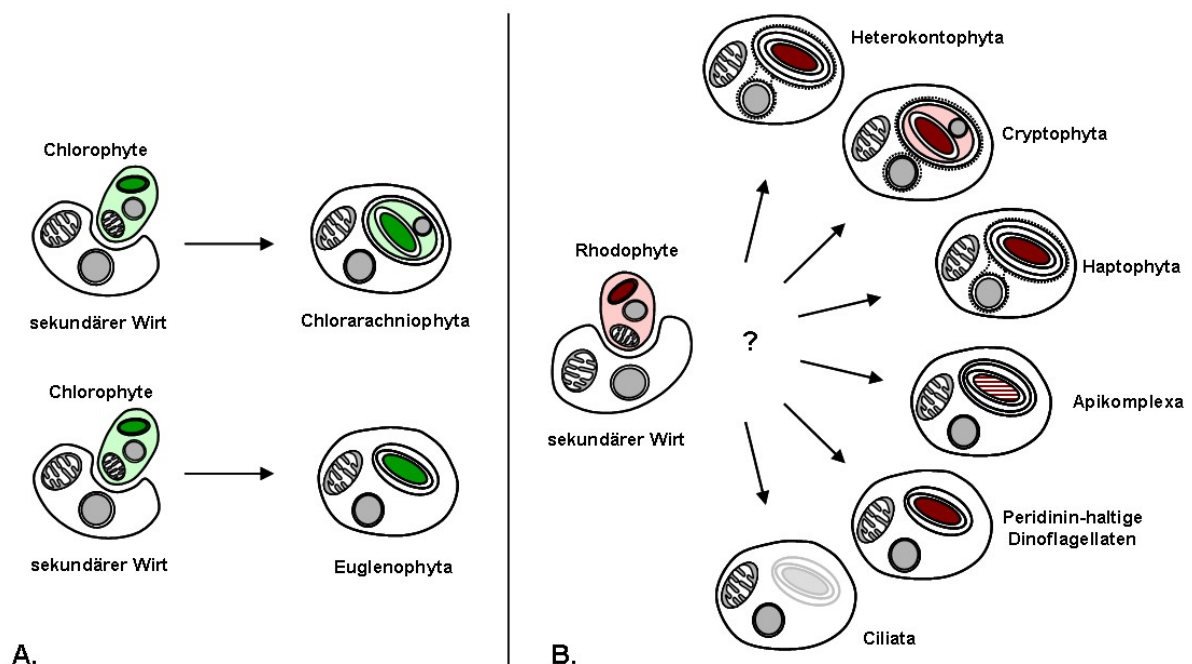


Abb. 1-2: Schematische Darstellung zur Entstehung sekundärer Plastiden. Sekundäre Plastiden sind im Rahmen sekundärer Endosymbiosen entstanden. Eine phototrophe eukaryote Zelle wurde erneut durch eine eukaryote Wirtszelle aufgenommen, als Symbiont etabliert und zur so genannten komplexen Plastide reduziert, die von drei bzw. vier Hüllmembranen umgeben ist. **A.** In der „grünen Linie“ werden Chlorarachniophyten und Euglenophyten unterschieden, die in zwei unabhängigen endosymbiontischen Ereignissen durch die Aufnahme einer Grünalge entstanden sind. **B.** In der „roten Linie“ werden Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten, Apikomplexe, Peridinin-haltige Dinoflagellaten und Ciliaten unterschieden. Alle diese Organismen werden überbegrifflich als Chromalveolaten zusammengefasst und sind durch die Aufnahme und Integration einer Rotalge entstanden. Ein monophyletischer Ursprung – wie er 1999 von Cavalier-Smith postuliert wurde – wird aktuell kontrovers diskutiert (modifizierte Abbildung nach Hjorth et al, 2004).

1.1.3 Die Chromalveolaten-Hypothese

Die Chromalveolaten-Hypothese wurde 1999 von Cavalier-Smith formuliert und postuliert, dass Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten, Apikomplexe, Peridinin-haltige Dinoflagellaten und Ciliaten einen monophyletischen Ursprung besitzen und somit im Rahmen einer einzigen sekundären Endosymbiose entstanden sind, bei der eine Rotalge von einer eukaroyten Wirtszelle aufgenommen und zur komplexen Plastide reduziert wurde (Cavalier-Smith, 1999) (Abb. 1-2, B). Diese Hypothese stützt sich zum einen auf morphologische Merkmale, Grundgedanke ist in erster Linie jedoch die Annahme, dass derart komplexe Vorgänge, die die Umstrukturierung zweier ursprünglich eigenständiger Zellen, den Transfer hunderter Gene sowie die Entwicklung neuer Maschinerien für den Proteinrücktransport fordern, wahrscheinlich nur selten stattgefunden haben (Cavalier-Smith, 1999; Cavalier-Smith, 2003). Ein vergleichbares Modell wurde auch für die „grüne Linie“ postuliert (Carbozoa-Hypothese, Cavalier-Smith 1999), jedoch durch phylogenetische Analysen später widerlegt (Rogers et al, 2007).

Phylogenetische Analysen symbiontenspezifischer Gene unterstützen die Chromalveolaten-Hypothese zu weiten Teilen. So legt beispielsweise die Duplikation oder der Austausch spezieller Gene nahe, dass der Symbiont in einem gemeinsamen Vorläufer dieser Organismen etabliert wurde (Fast et al, 2001; Harper & Keeling, 2003; Patron et al, 2004). Die Untersuchung wirtsspezifischer Gene, die in großem Maßstab erst in den letzten zwei Jahren durch verschiedene Genomprojekte möglich wurde, lässt hingegen vermuten, dass es sich um ursprünglich verschiedene Wirtszellen handelt und die Chromalveolaten somit keinen monophyletischen Ursprung haben. Diesen Analysen zufolge zeigen Cryptophyten und Haptophyten einen gemeinsamen Ursprung und unabhängig davon möglicherweise auch Heterokontophyten, Apikomplexe, Peridinin-haltige Dinoflagellaten und Ciliaten (Burki et al, 2008; Felsner et al, 2009; Hackett et al, 2007; Okamoto et al, 2009; Patron et al, 2007). In ihrer Gesamtheit werden diese Daten allerdings durchaus kontrovers diskutiert, und um Abweichungen zwischen symbiontenspezifischen und wirtsspezifischen Analysen zu begegnen, wurde kürzlich postuliert, dass Heterokontophyten, Apikomplexe und Peridinin-haltige Dinoflagellaten im Rahmen einer oder mehrerer tertiärer Endosymbiosen durch die Aufnahme einer Cryptophyte oder Haptophyte entstanden sind. Dieser Hypothese zufolge sind

Cryptophyten und Haptophyten durch eine singuläre sekundäre Endosymbiose entstanden und wurden anschließend durch eine tertiäre Endosymbiose als Symbiont in anderen Chromalveolaten verbreitet (Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008).

Eine weitere Studie zeigte kürzlich, dass in Diatomeen ein großer Anteil der symbiontenspezifischen Nukleus-kodierten Gene nicht auf die endosymbiontische Rotalge, sondern vielmehr auf eine Grünalge zurückgeht. Diese Beobachtung ist erstaunlich und legt nahe, dass der sekundäre Wirt im Fall der Diatomeen zuvor möglicherweise eine Plastide grünen Ursprungs besessen hat, die im Rahmen der sekundären Endosymbiose wieder eliminiert wurde (Moustafa et al, 2009). Ob ein ähnliches Phänomen auch bei anderen Chromalveolaten beobachtet werden kann, wird sich in zukünftigen Genomanalysen zeigen. Aktuelle phylogenetische Analysen verschiedener wirtsspezifischer Gene deuten zudem an, dass Cryptophyten und Haptophyten eine Schwestergruppe der „grünen Linie“ bilden (Felsner et al, 2009; Okamoto et al, 2009).

Im Ganzen muss die Chromalveolaten-Hypothese, die 10 Jahre als wohlstrukturiertes Modell für die Evolution der roten Linie diente, vermutlich neu überdacht werden. Die Entwicklung dieser sehr erfolgreichen Protisten, die einen Großteil der marinen Biomasse bilden, ist offensichtlich weitaus komplexer als bislang angenommen. Weitere phylogenetische Analysen sind notwendig und vermutlich muss auch die Entwicklung funktioneller Systeme als Marker berücksichtigt werden, um die Evolution der Chromalveolaten weiter aufzuklären.

1.2 Proteintransport in primäre und sekundäre Plastiden

Im Rahmen sowohl primärer als auch sekundärer Endosymbiose wurden tausende Gene des Endosymbionten in den Nukleus der Wirtszelle transferiert. In der Folge musste die Zelle Transportmechanismen entwickeln, um diese nun im Nukleus des Wirtes kodierten Proteine zurück in die primäre bzw. sekundäre Plastide und damit über zwei bzw. drei bis vier Membranen ins Stroma zu transportieren (Cavalier-Smith, 2003). In den folgenden Abschnitten werden Grundmechanismen des Präproteintransports in primäre und sekundäre Plastiden kurz zusammengefasst.

1.2.1 Proteintransport in primäre Plastiden

Der Proteinimport in die primären Plastiden höherer Pflanzen ist relativ gut untersucht (Bedard & Jarvis, 2005; Gutensohn et al, 2006; Soll & Schleiff, 2004). 95 % der plastidären Proteine werden im Wirtsgenom kodiert und müssen zurück in die Plastide und damit über zwei Hüllmembranen transportiert werden. Diese Proteine werden in der Regel als Vorläuferproteine mit einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz, dem Transitpeptid, im Cytosol der Zelle synthetisiert und post-translational über ein Translokatorsystem in das Stroma der Plastide importiert (Abb. 1-3-, F). Der Translokationsapparat besteht aus zwei oligomeren Proteinkomplexen, dem TOC-Komplex (*Translocon of the outer chloroplast membrane*) und dem TIC-Komplex (*Translocon of the inner chloroplast membrane*), die sich aus mehreren integralen und membranassoziierten Komponenten zusammensetzen. Die Spezifität des Importprozesses wird durch die Rezeptorproteine Toc34 und Toc159 vermittelt, die das Transitpeptid des Präproteins erkennen und unter Hydrolyse von GTP binden (Soll & Schleiff, 2004). Anschließend wird das Protein durch den Translokationskanal, bestehend aus dem Protein Toc75 in der äußeren Plastidenmembran und den Proteinen Tic110 und Tic20 in der inneren Membran, in das Stroma der Plastide transportiert. Der Translokationsprozess ist ATP-abhängig und erfolgt unter der Beteiligung verschiedener Chaperone (Bedard & Jarvis, 2005). Im Stroma wird das Transitpeptid letztendlich durch eine stromale Signalpeptidase abgespalten (Richter & Lamppa, 2002). Zusätzlich zu diesem klassischen TOC/TIC-vermittelten Importmechanismus werden einige wenige Proteine vermutlich über eine alternative Route zur Plastide transportiert. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass in höheren Pflanzen einige plastidäre Proteine anstelle eines Transitpeptids ein Signalpeptid tragen und damit durch einen bislang unbekannten Mechanismus über den sekretorischen Weg zur Plastide transportiert werden (Radhamony & Theg, 2006; Villarejo et al, 2005). Genomanalysen und Importstudien zeigen, dass der Importapparat der Archaeplastida (Rhodophyten, Chlorophyten und Glaucophyten) der TOC/TIC-Importmaschinerie höherer Pflanzen sehr ähnlich ist (Kalanon & McFadden, 2008; McFadden & van Dooren, 2004; Steiner et al, 2005).

1.2.2 Proteintransport in sekundäre Plastiden

Im Gegensatz zu primären Plastiden, die lediglich zwei Hüllmembranen besitzen, müssen bei sekundären Plastiden Nukleus-kodierte stromale Proteine über vier bzw. im Fall von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten über drei Membranen ins Stroma transportiert werden. Im Zuge der sekundären Endosymbiose mussten folglich erneut Transportsysteme entwickelt werden, um diese zusätzlichen Membranen zu überqueren (Hempel et al, 2007).

Auch wenn Chromalveolaten, Chlorarachniophyten und Euglenophyten durch unabhängige endosymbiontische Ereignisse entstanden sind (vgl. Abschnitt 1.1.2) und die Plastidenmorphologie auf den ersten Blick sehr unterschiedlich zu sein scheint, ist die Grundstruktur dieser Plastiden doch zumindest teilweise konserviert. So geht die äußerste Plastidenmembran vermutlich bei allen in sekundärer Endosymbiose entstandenen Organismen auf die ursprüngliche phagotrophe Vakuolenmembran zurück, die im Fall von Heterokontophyten, Haptophyten und Cryptophyten mit dem ER der Wirtszelle verschmolzen ist und als *chloroplast ER* (cER) bezeichnet wird (Bouck, 1965; Cavalier-Smith, 2003; Gibbs, 1979). Bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten, Apikomplexen, Chlorarachniophyten und Euglenophyten ist die äußere Plastidenmembran nicht mit dem ER der Wirtszelle verbunden, steht jedoch über Vesikel mit dem Endomembransystem in Kontakt (Cavalier-Smith, 2003). Bei der zweiten Plastidenmembran handelt es sich bei allen Plastiden mit vier Hüllmembranen vermutlich um die ehemalige Cytoplasmamembran des Symbionten, die im Falle der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten, die nur drei Hüllmembranen besitzen, wahrscheinlich eliminiert wurde (Cavalier-Smith, 1999; Cavalier-Smith, 2003). Die beiden inneren Membranen gehen vermutlich bei allen Organismen auf die Plastidenhülle der ursprünglich primären Plastide zurück.

Parallelen dieser Grundstruktur spiegeln sich auch in den Mechanismen der Proteinzielsteuerung wider. So tragen alle Nukleus-kodierten plastidären Proteine, unabhängig vom phylogenetischen Ursprung des sekundären Endosymbionten, am N-Terminus eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS, *bipartite topogenic signal*), die aus einem Signalpeptid und einem Transitpeptid besteht (Durnford & Gray, 2006; Gould et al, 2006a; Hirakawa et al, 2009; Lang et al, 1998; Patron et al, 2005; Rogers et al, 2004;

Waller et al, 1998; Wastl & Maier, 2000). Während das Signalpeptid die ko-translationale Synthese am ER einleitet und anschließend abgespalten wird, ist das Transitpeptid für alle weiteren Transportschritte essentiell (Bolte et al, 2009). Die Synthese Nukleus-kodierter symbiontenspezifischer Proteine beginnt folglich in allen Organismen, die sekundäre Plastiden besitzen, ko-translational am ER der Wirtszelle (Abb. 1-3, B-E und G-H). Diese ko-translationale Translokation entspricht bei Heterokontophyten, Haptophyten und Cryptophyten bereits dem Transport über die erste Plastidenmembran (Bhaya & Grossman, 1991; Lang et al, 1998; Wastl & Maier, 2000), da diese Membran mit dem ER der Wirtszelle in Verbindung steht (Abb. 1-3, B+C). In allen anderen Organismen müssen Präproteine zunächst über Vesikel an die äußere Plastidenmembran transportiert werden. Bei Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten existieren zwei Typen von Transitpeptiden, die Präproteine entweder durch eine hydrophobe Domäne in die ER/Vesikelmembran integrieren (Typ I) oder aber ohne eine solche Verankerung (Typ II) im Vesikellumen an die äußere Plastidenmembran dirigieren (Durnford & Gray, 2006; Patron et al, 2005). Sowohl in Euglenophyten als auch in Peridinin-haltigen Dinoflagellaten verläuft dieser Vesikeltransport vermutlich über den Golgi-Apparat (Nassoury et al, 2003; Slavikova et al, 2005; Sulli et al, 1999) (Abb. 1-3, E+H). Im Fall der Apikomplexen ist das Transitpeptid ebenfalls bereits für den Transport an den Apikoplast entscheidend (Foth et al, 2003; Tonkin et al, 2006a), möglicherweise handelt es sich hier um einen direkten Transport vom ER an die äußere Plastidenmembran ohne Beteiligung des Golgi-Apparates (DeRocher et al, 2005; Tonkin et al, 2006b) (Abb. 1-3, D). Bei den Chlorarachniophyten sind bislang keine Details über diesen Transportschritt bekannt. Auch hier ist jedoch das Transitpeptid für eine initiale Sortierung essentiell (Hirakawa et al, 2009).

Der Transport über die folgende Plastidenmembran, die zweite Plastidenmembran, ist bei vielen dieser Organismen unklar. Für Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexe wurde kürzlich postuliert, dass ein ERAD (ER-assoziierte Degradation)-ähnliches Transportsystem diesen Translokationsschritt vermittelt (Sommer et al, 2007) (Abb. 1-3, B-D). Wie diese Membran in den Chlorarachniophyten der grünen Linie überquert wird, ist bislang nicht bekannt (Abb. 1-3, G). In Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten wurde die äquivalente Membran vermutlich eliminiert (Abb. 1-3, E+H).

Der Transport über die beiden inneren Plastidenmembranen wird vermutlich in vielen dieser Organismen durch einen TOC/TIC-ähnlichen Mechanismus vermittelt, wie er in primären Plastiden konserviert ist. Auf dem Nukleomorphgenom der Chlorarachniophyte *Bigeloviella natans* ist ein Toc75-Homolog sowie ein zu Tic20 homologes Protein kodiert (Gilson et al, 2006). Dies spricht dafür, dass in diesen Organismen das ursprüngliche TOC/TIC-System der Archaeplastida erhalten wurde, um Präproteine über den *plastid envelope* zu transportieren (Abb. 1-3, G). In allen anderen Organismen wurden lange Zeit lediglich Komponenten der TIC-, nicht jedoch der TOC-Maschinerie identifiziert (McFadden & van Dooren, 2004). Erst kürzlich konnte auch in Diatomeen ein Toc75-Homolog in der dritten Plastidenmembran bestätigt werden (Bullmann et al, 2009). Ein entsprechender Kandidat wurde auch in den Genomen von Haptophyten und Apikomplexen identifiziert, so dass auch für diese Organismen ein TOC/TIC-vermittelter Präproteintransport an Membranen drei und vier wahrscheinlich ist (Abb. 1-3, C+D). Wie Präproteine über die inneren Plastidenmembranen von Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten transportiert werden, ist nach wie vor nicht bekannt. Möglicherweise wurde auch hier das TOC/TIC-System der primären Plastide erhalten, wie Importversuche mit isolierten Erbsenplastiden nahe legen (Chaal & Green, 2005; Inagaki et al, 2000). Bislang stehen allerdings nicht genügend Sequenzdaten zur Verfügung, um entsprechende Komponenten identifizieren zu können.

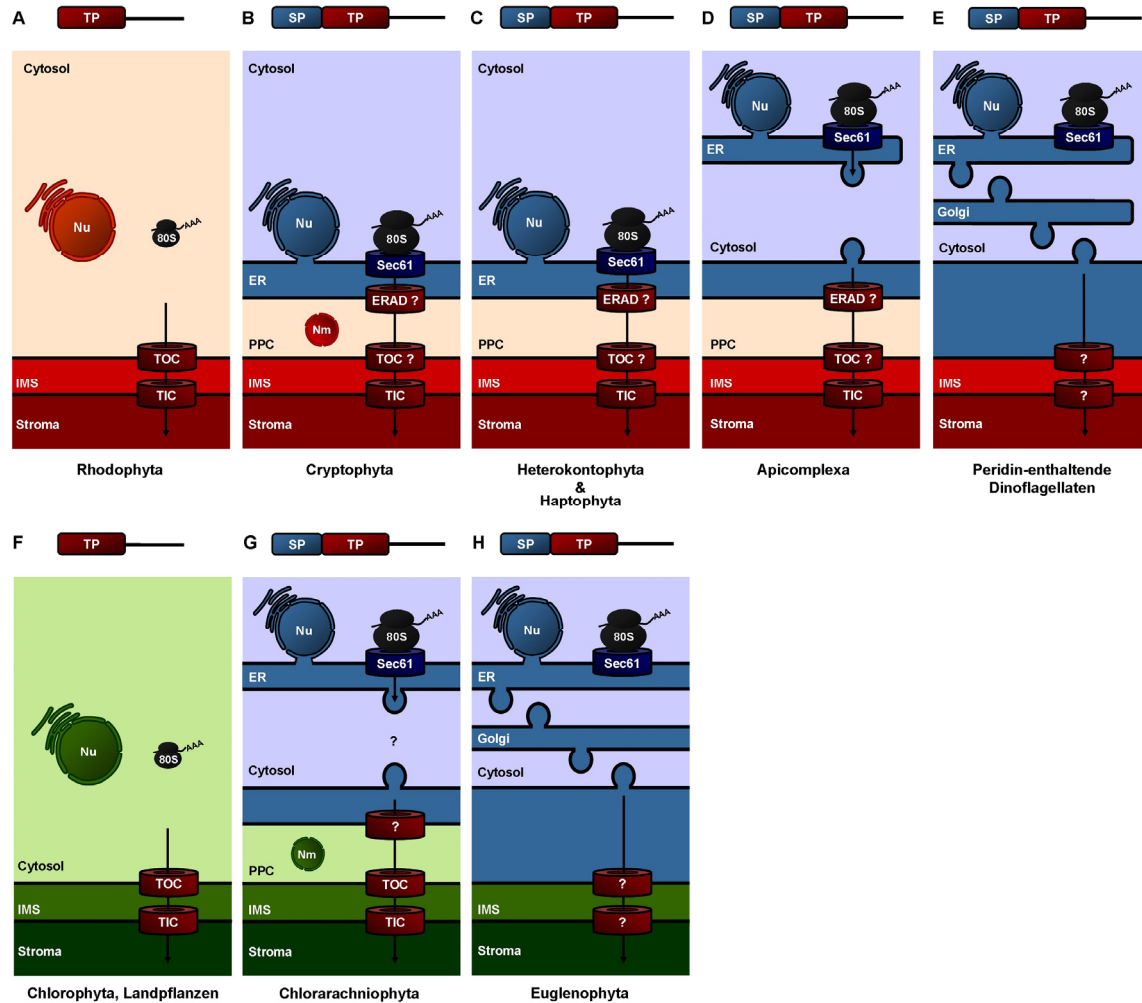


Abb. 1-3: Schematische Darstellung zum Präproteintransport in primäre und sekundäre Plastiden. Nukleus-kodierte plastidäre Proteine werden bei primären und sekundären Plastiden als Präproteine mit einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz synthetisiert. Im Fall primärer Plastiden handelt es sich dabei um ein Transitpeptid (TP), das für einen TOC/TIC-vermittelten Transport an der Plastidenhülle notwendig ist (A+F). Nukleus-kodierte Proteine sekundärer Plastiden tragen hingegen eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS), die aus einem Signalpeptid (SP) und einem Transitpeptid (TP) besteht. Der Präproteintransport beginnt folglich mit der ko-translationalen Synthese am ER (B-E,G,H) und ist im Fall der Cryptophyten, Heterokontophyten und Haptophyten direkt mit dem Transport über die äußere Plastidenmembran verbunden (B,C). Bei Apikomplexen und Peridin-inhaltigen Dinoflagellaten der roten Linie, aber auch bei Chlorarachniophyten und Euglenophyten der grünen Linie müssen Präproteine hingegen erst über Vesikel an die äußere Plastidenmembran transportiert werden (D,E,G,H). Der Transport über die zweite Plastidenmembran wird in Cryptophyten, Heterokontophyten, Haptophyten und Apikomplexen möglicherweise durch ein ERAD-ähnliches Transportsystem vermittelt (B-D). Während über diesen Transportschritt in Chlorarachniophyten nichts bekannt ist (G), haben sowohl Peridin-inhaltige Dinoflagellaten als auch Euglenophyten die entsprechende Membran eliminiert (E,H). Der Transport über die inneren beiden Plastidenmembranen erfolgt bei den meisten Organismen vermutlich mit Hilfe eines TOC/TIC-Systems (B-D,G). Möglicherweise ist der Transport bei Peridin-inhaltigen Dinoflagellaten und Euglenophyten ähnlich; vergleichbare Komponenten wurden bislang jedoch nicht identifiziert (E,H). ERAD – ER-assoziierte Degradation, IMS – intermembrane space, Nm – Nukleomorph, Nu – Nukleus, PPC – periplastidäres Kompartiment, TIC/TOC – Translocon of the inner/outer chloroplast membrane (Abbildung aus Hempel et al. 2007, modifiziert).

1.2.3 Proteintransport in die komplexe Plastide von *P. tricornutum* im Speziellen

Modellorganismus dieser Arbeit ist die pennate Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*. Diatomeen gehören zur Gruppe der Heterokontophyten und besitzen komplexe Plastiden, die von vier Membranen umgeben sind. Eine Übersicht zur Membranorganisation ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Wie in Abschnitt 1.2.2 bereits beschrieben wurde, steht in Heterokontophyten die äußere Plastidenmembran (I.) mit der ER-Membran des Wirtes in Verbindung (Gibbs, 1979) und ist vermutlich durch eine Fusion der ursprünglichen phagosomalen Membran mit dem Endomembransystem entstanden (Cavalier-Smith, 2003). Die zweite Plastidenmembran (II.) wird als periplastidäre Membran (PPM) bezeichnet und umschließt das so genannte periplastidäre Kompartiment (PPC), welches ursprünglich auf das Cytosol des Endosymbionten zurückgeht. Im Gegensatz zu Cryptophyten und Chlorarachniophyten, die im PPC den Nukleus des Symbionten als Nukleomorph erhalten haben, ist das periplastidäre Kompartiment in Heterokontophyten stark reduziert. Das PPC der Diatomeen beinhaltet weder ein Nukleomorph noch eine Maschinerie zur Proteinbiosynthese und bislang sind keine Stoffwechselwege dieses Kompartiments bekannt. Die beiden inneren Plastidenmembranen (III. + IV.) entsprechen der Plastidenhülle der primären Plastide (Cavalier-Smith, 2003).

Bedingt durch diese komplexe Membranorganisation müssen plastidäre Proteine, die im Nukleus der Wirtszelle kodiert sind, folglich über bis zu vier bzw. im Fall von Proteinen der Thylakoide sogar über fünf Membranen transportiert werden. Zudem muss während des Transports eine Unterscheidung verschiedener Proteinpopulationen erfolgen. Während periplastidäre Proteine beispielsweise nur die zwei äußeren Membranen passieren und im PPC verbleiben, müssen stromale Proteine zusätzlich über die beiden inneren Membranen transportiert werden (Abb. 1-4).

Ein gemeinsames Merkmal aller Nukleus-kodierten Plastidenproteine ist eine N-terminale zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS), die aus einem Signalpeptid und einem Transitpeptid besteht (Apt et al, 2002; Bhaya & Grossman, 1991; Gruber et al, 2007; Lang et al, 1998). Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien haben bestätigt, dass es sich bei dem ersten Teil der BTS um ein funktionelles Signalpeptid handelt, das den Transport ins

ER und damit einen Transport über die erste Plastidenmembran vermittelt (Bhaya & Grossman, 1991; Kilian & Kroth, 2005; Lang et al, 1998). Der Transport über die erste Membran erfolgt somit ko-translational über den Sec61-Komplex, anschließend wird das Signalpeptid von einer Signalpeptidpeptidase abgespalten (Abb. 1-4). Der zweite Teil der Zielsteuerungssequenz zeigt Charakteristika eines Transitpeptids und Importstudien mit isolierten Erbsenplastiden bestätigen, dass es sich um ein funktionelles Transitpeptid handelt (Lang et al, 1998). Dieses Transitpeptid ist für den Transport über die weiteren Membranen bis ins Stroma der Plastide essentiell (Apt et al, 2002; Gould et al, 2006b; Kilian & Kroth, 2005).

Wie Präproteine über die zweite Plastidenmembran transportiert werden, ist unklar. Sowohl Vesikel-vermittelte Mechanismen als auch verschiedene Translokator-Modelle wurden auf theoretischer Basis diskutiert (Bodyl, 2004; Cavalier-Smith, 2003; Gibbs, 1979; Kilian & Kroth, 2005). Ein experimentell zugängliches Modell wurde erstmals von Sommer et al. beschrieben und postuliert, dass der Transport an der periplastidären Membran über ein ERAD (ER-assoziierte Degradation)-ähnliches Translokationssystem vermittelt wird (Sommer et al, 2007). Die Untersuchung dieser Hypothese ist Zielsetzung dieser Arbeit.

Nach dem Transport über die zweite Plastidenmembran muss im periplastidären Kompartiment eine Unterscheidung erfolgen zwischen Proteinen, die im periplastidären Kompartiment verbleiben und Proteinen, die weiter über die dritte und vierte Plastidenmembran ins Stroma der Plastide transportiert werden (Abb. 1-4). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die +1 Position des Transitpeptids bei diesem Unterscheidungsprozess eine kritische Rolle spielt. Während stromale Proteine an dieser Position immer eine aromatische Aminosäure (oder in seltenen Fällen ein Leucin) tragen, und zwar i. d. R. ein Phenylalanin (F) (Apt et al, 2002; Gruber et al, 2007; Kilian & Kroth, 2005), besitzen periplastidäre Proteine an der +1 Position des Transitpeptids hingegen keine aromatische Aminosäure (Gould et al, 2006a; Gould et al, 2006b). Im Weiteren zeigte die gezielte Mutagenese dieser kritischen Position, dass alleine die +1 Position des Transitpeptids für eine Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine entscheidend ist (Gould et al, 2006a; Gruber et al, 2007). Nach dem Transport über die zweite Membran wird das Transitpeptid periplastidärer Proteine vermutlich abgespalten

(Gould et al, 2006b), wie es für periplastidäre Proteine der Cryptophyen bereits gezeigt wurde (Deschamps et al, 2006).

Der Transport über die dritte und vierte Plastidenmembran ins Plastidenstroma erfolgt vermutlich durch ein TOC/TIC-ähnliches Transportsystem (Abb. 1-4). Verschiedene Komponenten der TIC-Maschinerie (Tic110, Tic20, Tic22, Tic82) sind im Genom von Diatomeen kodiert (McFadden & van Dooren, 2004), und kürzlich konnte mit einem Toc75-Homolog eine weitere zentrale Komponente des Transportsystems aus primärer Endosymbiose identifiziert werden (Bullmann et al, 2009; Wunder et al, 2007). Das zu Toc75 homologe Protein besitzt charakteristische Merkmale der zentralen Pore der TOC-Maschinerie und ist in der dritten Plastidenmembran von *P. tricornutum* lokalisiert (Bullmann et al, 2009).

P. tricornutum ist als Modellorganismus für die Untersuchung des Präproteintransports in komplexe Plastiden aus verschiedenen Gründen sehr gut geeignet. Ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu anderen transfizierbaren Chromalveolaten ist, dass die verschiedenen Kompartimente der komplexen Plastide im Rahmen von *in vivo* Lokalisationsstudien klar unterschieden werden können. So können GFP-Fusionsproteine gezielt über die erste Plastidenmembran (ins ER), über die zweite Plastidenmembran (ins PPC) oder über alle vier Plastidenmembranen (ins Stroma) dirigiert werden (Apt et al, 2002; Gould et al, 2006b; Kilian & Kroth, 2005). Jedes Kompartiment zeigt eine charakteristische GFP-Fluoreszenz, die klar von anderen Lokalisationen zu unterscheiden ist (Abb. 1-4).

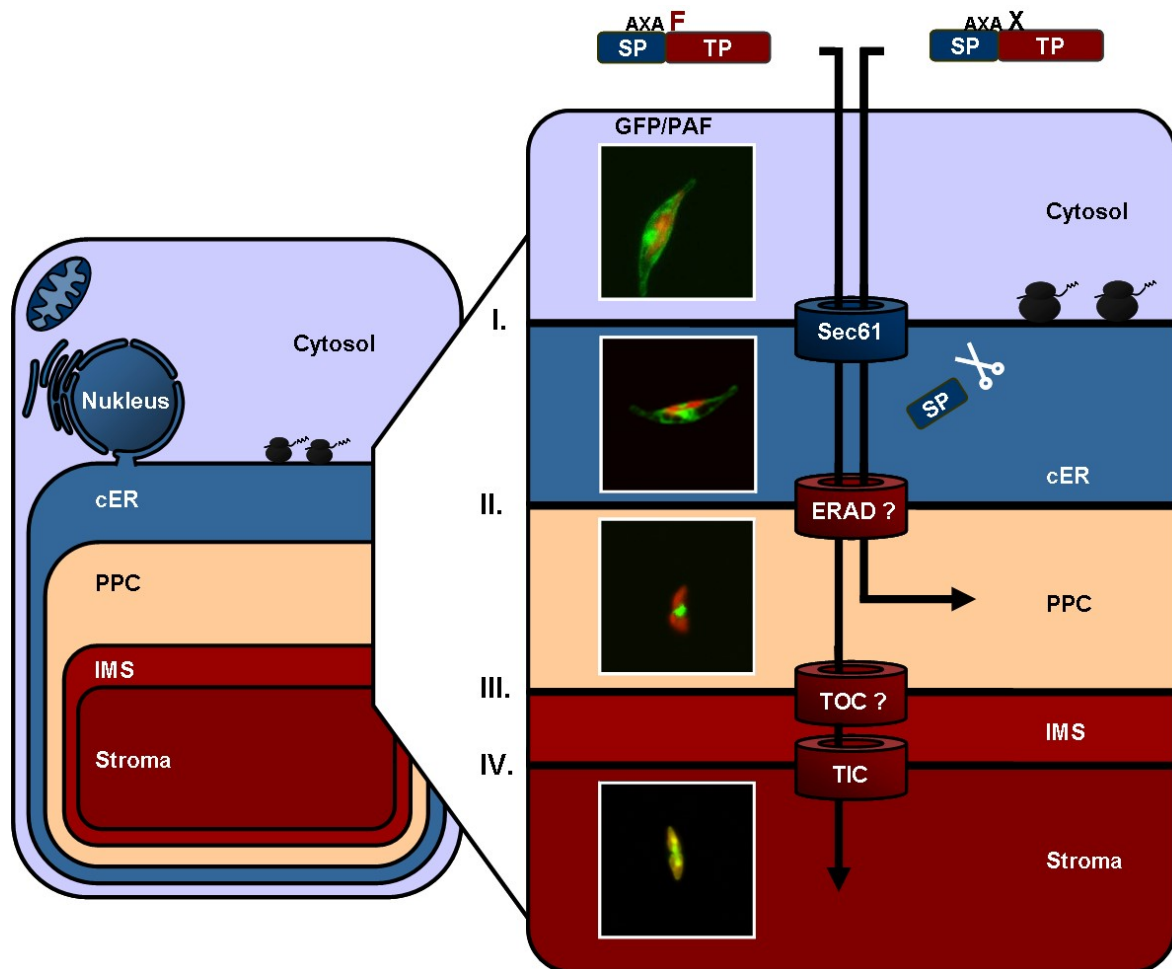


Abb. 1-4: Schematische Darstellung zum Präproteintransport in die komplexe Plastide der Diatomee *P. tricornutum*. Die komplexe Plastide von *P. tricornutum* ist von vier Membranen umgeben (I.-IV.), wobei die äußerste Membran mit dem ER der Wirtszelle in Verbindung steht. Nukleus-kodierte plastidäre Proteine tragen eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS) am N-Terminus, die aus einem Signalpeptid (SP) und einem Transitpeptid (TP) besteht. Während stromale Proteine an der +1 Position des Transitpeptids eine aromatische Aminosäure - i. d. R. ein Phenylalanin (F) - tragen, ist diese Position bei Proteinen des periplastidären Kompartiments (PPC) durch eine nicht-aromatische Aminosäure besetzt (X). Das Signalpeptid vermittelt den ko-translationalen Transport ins ER und damit über die erste Plastidenmembran (I.) und wird anschließend abgespalten. Das Transitpeptid ist für den Transport über alle weiteren Membranen notwendig. Der Transport an der zweiten Plastidenmembran ist bislang unklar, postuliert wird ein ERAD-ähnliches Translokationssystem. Der Transport an den Membranen III. und IV. wird vermutlich durch ein TOC/TIC-System vermittelt, wie es bei den Archaeplastida konserviert ist. Im Rahmen von *in vivo* Lokalisationsstudien können GFP-Fusionsproteine in unterschiedliche Kompartimente der komplexen Plastide von *P. tricornutum* dirigiert werden. GFP-Fluoreszenzen in ER, PPC und Stroma zeigen charakteristische Muster und können klar unterschieden werden. Die GFP-Fluoreszenz ist in grün, die Plastidenautofluoreszenz in rot dargestellt. cER – chloroplast ER, ERAD – ER-assoziierte Degradation, IMS – intermembrane space, PAF – Plastidenautofluoreszenz, PPC – periplastidäres Kompartiment, SP – Signalpeptid, TOC/TIC – Translocon of the outer/inner chloroplast membrane, TP – Transitpeptid.

1.3 Das ERAD-Translokationssystem

Bislang ist unklar, wie Nukleus-kodierte plastidäre Proteine über die zweite Membran komplexer Plastiden transportiert werden. Auf theoretischer Basis wurde für Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexe postuliert, dass sich der Präproteintransporter der periplastidären Membran von einem Transportsystem der ER-Membran – dem ERAD (ER-associated degradation)-Translokationsapparat – ableitet (Sommer et al, 2007).

In den folgenden Abschnitten wird das ERAD-System und im Speziellen der Mechanismus der Substrattranslokation am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* genauer dargestellt. Im Anschluss wird kurz auf die von Sommer et al. beschriebene Hypothese Bezug genommen.

1.3.1 ER-assozierte Degradation (ERAD)

Im endoplasmatischen Retikulum existieren keine proteolytischen Systeme, nichtsdestotrotz müssen falsch gefaltete oder aberrante Proteine aussortiert und degradiert werden. Diese Funktion erfüllt ein System, das als ER-assozierte Degradation (ERAD) bezeichnet wird und in niederen und höheren Eukaryoten stark konserviert ist. Falsch gefaltete Proteine werden vom ER zurück ins Cytosol transportiert und dort im Proteasom abgebaut (Meusser et al, 2005; Nakatsukasa & Brodsky, 2008; Tsai et al, 2002).

Die ER-assozierte Degradation gliedert sich in drei Abschnitte i) Substraterkennung im ER, ii) Retrotranslokation, iii) proteasomale Degradation.

1.3.1.1 Substraterkennung im ER

Ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine exponieren in verstärktem Maß hydrophobe Domänen und sind aus diesem Grund größten Teils mit Chaperonen assoziiert. Die Bindungsdauer in verschiedenen Chaperonzyklen stellt vermutlich einen initialen Erkennungsmechanismus für ERAD-Substrate dar, der im Fall falsch gefalteter Glykoproteine relativ gut untersucht ist (Clerc et al, 2009). Bei der N-Glykosylierung wird ein Glc₃Mn₉GlcNAc₂ Oligoglykan bereits während der ko-translationalen Synthese auf die

naszierende Polypeptidkette übertragen. Im Folgenden werden die Zuckerreste sukzessive modifiziert und liefern dabei gleichzeitig Informationen über den Faltungsstatus des Proteins (Helenius & Aebi, 2004). In höheren Eukaryoten werden zunächst die Glukosereste des Oligoglykans sequentiell abgespalten und das Protein wird von den Chaperonen Calnexin und Calretikulin gebunden (Molinari, 2007). Im Fall einer korrekten Faltung wird das Protein im Anschluss entlassen, erfährt weitere Modifikationen und tritt in den sekretorischen Weg ein. Treten bei der Faltung jedoch Probleme auf, bleibt das Protein an Calnexin/Calretikulin gebunden (Helenius et al, 1997; Zhang et al, 1997). Die Bindungsdauer erfüllt in diesem Fall eine Art „Timer-Funktion“. Bei falsch gefalteten Proteinen, die lange an die Chaperone gebunden bleiben, wird durch das Enzym Mannosidase I (Msn I) ein terminaler Mannoserest des Zuckergerüsts entfernt – resultierend in einem $Mn_8GlcNAc_2$ -Glykan (Camirand et al, 1991; Tremblay & Herscovics, 1999). Nach neuen Untersuchungen wird diese Struktur in *S. cerevisiae* von einer weiteren Mannosidase (Htm1p) prozessiert, so dass ein Oligoglykan mit nur 7 Mannoseresten ($Mn_7GlcNAc_2$) entsteht, welches im Folgenden als spezifisches Signal für die Erkennung von ERAD-Substraten dient (Clerc et al, 2009). Anschließend wird das Substrat von dem Lektin Yos9p und Chaperonen gebunden (Bhamidipati et al, 2005; Buschhorn et al, 2004) und durch das membranständige Protein Hrd3p an den ERAD-Komplex in der ER-Membran rekrutiert (Denic et al, 2006).

Wie nicht-glykosylierte Proteine vom ERAD-Komplex erkannt werden, ist bislang weitgehend unklar. Möglicherweise spielt das Protein Hrd3p auch bei der Rekrutierung dieser Proteine - unabhängig von Yos9p - eine Rolle (Gauss et al, 2006).

1.3.1.2 Retrotranslokation

Abhängig davon, ob es sich beim Substrat um ein lösliches Protein oder ein Membranprotein handelt und je nach Position der Läsion werden in *S. cerevisiae* drei Typen der ER-assoziierten Degradation unterschieden: ERAD-L (lösliche Proteine und Membranproteine mit lumenalen Läsionen), ERAD-M (Membranproteine mit Läsionen in Transmembrandomänen) und ERAD-C (Membranproteine mit cytosolischen Läsionen) (Carvalho et al, 2006; Vashist & Ng, 2004). Im Zentrum aller drei Mechanismen steht die Ubiquitinierung von Substratproteinen durch eine RING-Finger Ubiquitin-Ligase sowie die

Extraktion der Substrate durch die Ubiquitin-abhängige ATPase Cdc48p (Ismail & Ng, 2006). Auch wenn die Mechanismen aller drei ERAD-Typen grundsätzlich ähnlich sind, verläuft der eigentliche Translokationsprozess möglicherweise unterschiedlich. Der ERAD-L Weg ist in Abbildung 1-5 dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

Zumindest im Fall falsch gefalteter löslicher Proteine (ERAD-L) muss eine Art Transportkanal postuliert werden, durch den Substrate vom ER-Lumen ins Cytosol transportiert werden. Welche Proteine diesen Transportkanal bilden, ist bislang allerdings nicht bekannt. Verschiedene Kandidaten, wie der Sec61-Komplex oder aber das Membranprotein Der1p aus *S. cerevisiae* bzw. die Homologen aus dem Säugersystem Derlin1-3, werden kontrovers diskutiert (Meusser et al, 2005; Nakatsukasa & Brodsky, 2008). Der1p (*Degradation at the ER 1*) wurde als erste Komponente des ERAD-L Komplexes identifiziert und ist für die Degradation löslicher ERAD-Substrate essentiell (Hitt & Wolf, 2004; Knop et al, 1996). Eine Deletion des Proteins führt dazu, dass lösliche Substrate nicht mehr degradiert werden können und im ER akkumulieren (Knop et al, 1996). Die Derlin-Proteine aus dem Säugersystem bilden einen oligomeren Komplex in der ER-Membran und interagieren mit verschiedenen ERAD-Substraten (Bernardi et al, 2008; Lilley & Ploegh, 2004; Lilley & Ploegh, 2005; Oda et al, 2006; Ye et al, 2004). Der1p spielt im ERAD-L System folglich eine zentrale Rolle, ist für die Degradation von Membranproteinen mit cytosolischen Läsionen (ERAD-C) oder Läsionen innerhalb von Transmembrandomänen (ERAD-M) allerdings nicht essentiell (Carvalho et al, 2006; Taxis et al, 2003).

Eine weitere Kernkomponente des ERAD-L Membrankomplexes ist die RING-Finger Ubiquitin-Ligase Hrd1p (Bordallo et al, 1998). Hrd1p (*HMG-coA Reductase Degradation 1*) ist ein Membranprotein mit sechs Transmembrandomänen und besitzt auf cytosolischer Seite eine charakteristische RING-Finger-Domäne, die den Transfer von Ubiquitinmolekülen auf verschiedene ERAD-Substrate katalysiert (Bays et al, 2001; Deak & Wolf, 2001). Wie auch im Fall anderer Ubiquitin-Ligasen ist dieser Prozess von E1- und E2- Enzymen abhängig, die das Ubiquitinmolekül zuvor aktivieren und an die Ligase (E3-Enzym) binden (Deshaies & Joazeiro, 2009; Kostova et al, 2007). In *S. cerevisiae* wird Ubiquitin zunächst von dem Protein Uba1p (*Ubiquitin activating enzyme 1*) durch eine Thioesterbindung gebunden und dadurch aktiviert (McGrath et al, 1991). Anschließend

wird das Ubiquitinmolekül auf ein Ubc-Protein (*Ubiquitin conjugating enzyme*) übertragen. Bei der ER-assoziierten Degradation sind die Proteine Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p an diesem Prozess beteiligt (Friedlander et al, 2000). Die Ubiquitin-Ligase bindet schließlich sowohl das Substrat als auch das aktivierte Ubiquitin-konjugierende Enzym und katalysiert den finalen Transfer des Ubiquitinmoleküls auf das Substrat (Kostova et al, 2007). Diese Ubiquitinierung dient zum einen als Markierung für den proteasomalen Abbau, ist zum anderen jedoch bereits für den Prozess der Retrotranslokation essentiell (de Virgilio et al, 1998; Shamu et al, 2001). Durch eine Deletion der Ubiquitin-Ligase Hrd1p akkumulieren ERAD-Substrate im ER und werden nicht mehr ins Cytosol transportiert (Bordallo et al, 1998; Garza et al, 2009). Während Hrd1p die Oligoubiquitinierung von ERAD-L und ERAD-M Substraten vermittelt, wird diese Aufgabe im Fall von Membranproteinen mit cytoplasmatischen Läsionen (ERAD-C) von der Ubiquitin-Ligase Doa10p (*Degradation of alpha2 10*) übernommen (Carvalho et al, 2006; Swanson et al, 2001).

Neben Der1p und Hrd1p gehören mindestens drei weitere Proteine zum ERAD-L Membrankomplex: Hrd3p, Usa1p und Cue1p (Ismail & Ng, 2006). Wie bereits in Abschnitt 1.3.1.1. beschrieben, handelt es sich bei dem Protein Hrd3p um einen Rezeptor, welcher ERAD-Substrate – direkt oder aber in Abhängigkeit von Yos9p – im ER erkennt und an die ER-Membran rekrutiert (Denic et al, 2006; Gauss et al, 2006; Plemper et al, 1999). Durch die Dimerisierung mit Hrd1p stabilisiert Hrd3p zudem den Ligase-Komplex (Gardner et al, 2000). Das Protein Usa1p (*U1-Snp1 Associating 1*) wurde erst kürzlich als ERAD-Komponente identifiziert und vermittelt eine Interaktion von Der1p und Hrd1p (Carvalho et al, 2006). Weitere Funktionen sind bislang nicht bekannt. Cue1p (*Coupling of ubiquitin-conjugation to ER-degradation 1*) bindet und rekrutiert das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7p an die ER-Membran und den Hrd1-Ligase-Komplex (Biederer et al, 1997).

Wie auch im Fall anderer Transportsysteme ist für den eigentlichen Translokationsprozess Energie erforderlich, die beim ERAD-System – unabhängig vom Substrat (ERAD-L, ERAD-M und ERAD-C) – durch die Ubiquitin-abhängige ATPase Cdc48p (p97 im Säugersystem) geliefert wird (Jarosch et al, 2002; Ye et al, 2001). Cdc48p (*Cell division cycle 48*) gehört zu den AAA-ATPasen (*ATPase family associated with various cellular activities*) und besitzt eine homohexamere ringförmige Struktur (Rouiller et al, 2000; Zhang et al, 2000).

Abhängig von verschiedenen Kofaktoren ist Cdc48p an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt (Latterich et al, 1995; Sato & Hampton, 2006). Im Rahmen von ERAD bindet Cdc48p zusammen mit den Kofaktoren Ufd1p (*Ubiquitin fusion degradation 1*) und Npl4p (*Nuclear protein localisation 4*) an ubiquitinierte ERAD-Substrate und extrahiert diese aus der ER-Membran (Bays & Hampton, 2002; Ye et al, 2003). Dieser Extraktionsprozess ist von einer zyklischen ATP-Hydrolyse begleitet, die vermutlich strukturelle Veränderungen des hexameren Rings induziert und dadurch das gebundene Substrat mobilisiert (Rouiller et al, 2002; Zhang et al, 2000). Untersuchungen mit Cdc48-Mutanten machen die essentielle Rolle des Proteins für den Translokationsprozess deutlich (Ye et al, 2001; Ye et al, 2003). Cdc48p wird vermutlich durch das Protein Ubx2p (*Ubiquitin regulatory X*) an die ER-Membran rekrutiert (Neuber et al, 2005; Schuberth & Buchberger, 2005) und tritt während der Extraktion von ERAD-Substraten mit verschiedenen Komponenten des ERAD-L Komplexes, wie Der1p und Hrd1p, in Wechselwirkung (Carvalho et al, 2006; Lilley & Ploegh, 2005; Ye et al, 2004). Im Ganzen ist der Cdc48-Komplex essentiell für die Extraktion aller Typen von ERAD-Substraten (ERAD-L, ERAD-M und ERAD-C) und gewährleistet einen directionalen Ablauf des Translokationsprozesses.

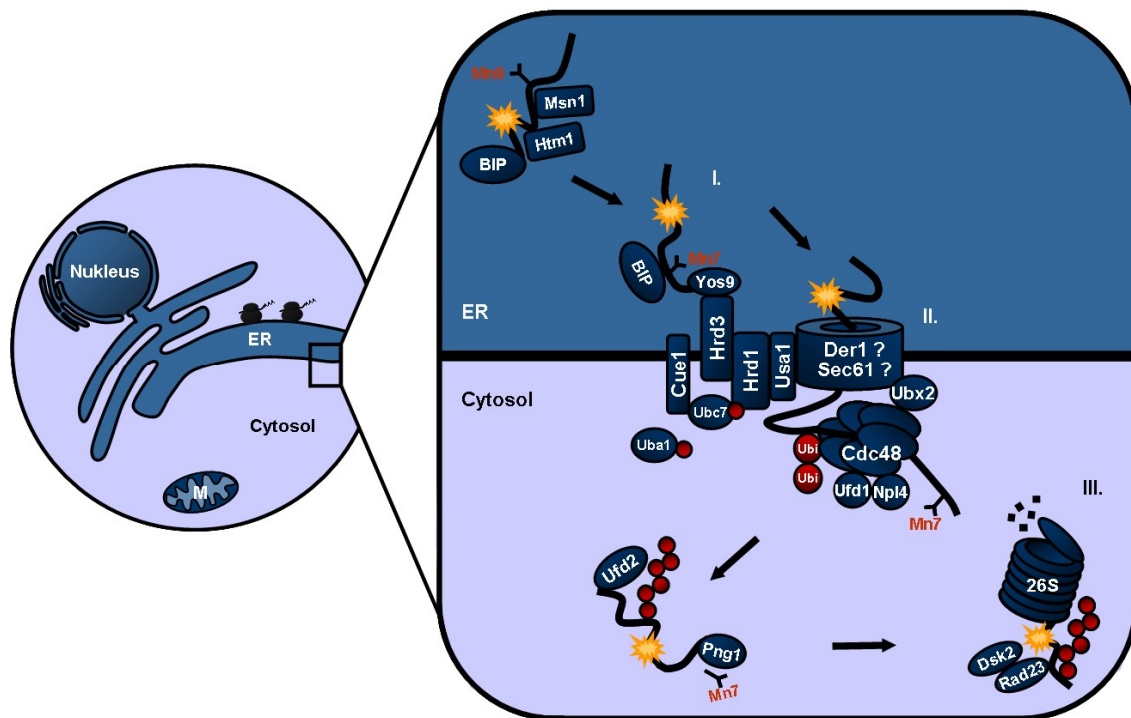


Abb. 1-5: Schematische Darstellung zur ER-assoziierten Degradation eines Substrats mit lumenaler Läsion (ERAD-L) in *S. cerevisiae*. Falsch gefaltete Proteine werden I) im ER als solche erkannt, II.) zurück ins Cytosol transportiert und III.) im 26S-Proteasom degradiert. Das $\text{Glc}_3\text{Mn}_9\text{GlcNAc}_2$ -Grundgerüst von N-glykosylierten Proteinen mit lumenalen Läsionen (durch Sterne markiert) wird durch die Mannosidasen Msn1p und Htm1p auf eine N-Acetylglucosamin-Struktur mit 7 Mannoseresten (Mn7) reduziert. Dieses Oligoglykan dient als spezifisches ERAD-Signal und wird von dem Lektin Yos9 gebunden, das mit Hilfe von Hrd3 an den ERAD-Membrankomplex rekrutiert wird. Falsch gefaltete Proteine werden anschließend an einen Translokationskanal geführt, der möglicherweise durch Der1-Proteine oder den Sec61-Komplex gebildet wird. Anschließend wird das Substrat auf der cytoplasmatischen Seite durch die Ubiquitin-Ligase Hrd1 oligoubiquitiniert (Ubiquitin-Moleküle sind in rot dargestellt). Derart markierte Substrate werden durch die Ubiquitin-abhängige ATPase Cdc48 und die Kofaktoren Ufd1 und Npl4 gebunden und unter Energieverbrauch aus der Membran extrahiert. Das E4-Enzym Ufd2 verlängert die Ubiquitinkette auf 3-6 Ubiquitin-Moleküle, so dass die Faktoren Rad23 und Dsk2 binden können, um das Protein zum Proteasom zu eskortieren. Vor der proteasomalen Degradation werden Glykane durch die Glykanase Png1 abgespalten. Nicht genannte Komponenten und Detailinformationen zu den abgebildeten Mechanismen sind dem Text zu entnehmen. M – Mitochondrium, Mn – Mannose, Ubi – Ubiquitin.

1.3.1.3 Proteasomale Degradation

Im Anschluss an die Retrotranslokation werden die ubiquitinierten ERAD-Substrate durch ein E4-Enzym, das Protein Ufd2p (*Ubiquitin-fusion degradation 2*), polyubiquitiniert (Koegl et al, 1999; Richly et al, 2005). Ufd2p bindet an den Substrat-Cdc48-Komplex und verlängert die Ubiquitinkette auf eine Anzahl von drei bis sechs Ubiquitin-Molekülen

durch eine Verknüpfung am Lysin48 (Richly et al, 2005). Die Länge der Ubiquitinkette ist kritisch für die Bindung weiterer Faktoren wie Rad23p (*Radiation sensitive 23*) und Dsk2p (*Dominant suppressor of Kar1 2*), die das Substrat zum Proteasom eskortieren (Medicherla et al, 2004; Richly et al, 2005). Sind Teile dieses Prozesses gestört, wie die Polyubiquitinierung durch Ufd2p oder die Bindung von Rad23p und Dsk2p, findet keine proteasomale Degradation statt (Richly et al, 2005). Im Fall von Glykoproteinen werden Zuckerketten durch die Glykanase Png1p (*Peptide N-Glycanase 1*) abgespalten (Hirsch et al, 2003; Suzuki et al, 2000), die mit Rad23p einen Komplex bildet (Kim et al, 2006). Im Anschluss folgt die Degradation im 26S-Proteasom (Kostova & Wolf, 2003; Voges et al, 1999).

1.3.2 Symbiontenspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten

In silico Analysen haben gezeigt, dass Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexe zentrale Komponenten der ERAD-Translokationsmaschinerie in zwei Varianten besitzen, einer wirtsspezifischen Version und einer symbiontenspezifischen Version (Sommer et al, 2007). Symbiontenspezifische ERAD-Faktoren wurden erstmals in der Cryptophyte *Guillardia theta* auf dem Nukleomorphgenom identifiziert. Homologe der Ubiquitin-Ligase Hrd1, des Proteins Der1, der ATPase Cdc48 sowie des Cdc48-Kofaktors Ufd1 sind auf diesem reduzierten Zellkern des Endosymbionten kodiert. In Heterokontophyten, Haptophyten und Apikomplexen, in denen der Zellkern des Endosymbionten eliminiert wurde, sind diese und weitere symbiontenspezifische ERAD-Faktoren im Nukleus der Wirtszelle kodiert und tragen am N-Terminus eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz (BTS) für das periplastidäre Kompartiment (Sommer et al, 2007). Durch *in vivo* Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionskonstrukten konnte bestätigt werden, dass diese Faktoren, im Unterschied zu den wirtsspezifischen ERAD-Faktoren, in die komplexe Plastide dirigiert werden (Agrawal et al, 2009; Felsner et al, 2009; Kalanon et al, 2009; Sommer et al, 2007; Spork et al, 2009). Abbildung 1-6 zeigt ERAD-Komponenten, die sowohl als wirtsspezifische Variante (h ERAD) als auch symbiontenspezifische Variante (s ERAD) in den verschiedenen Organismen vorkommen. Eine Tabelle aller bislang identifizierten wirts- und symbiontenspezifischen Faktoren mit den dazugehörigen Proteinidentifikationsnummern ist Tabelle A-1 im Anhang zu entnehmen.

Die Tatsache, dass zentrale Komponenten der symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsmaschinerie in Heterokontophyten, Cryptophyten, Haptophyten und Apikomplexen gleichermaßen erhalten blieben, obwohl das symbiontenspezifische ER nicht mehr vorhanden ist, legt nahe, dass diese Faktoren eine essentielle, aber vermutlich modifizierte Funktion erfüllen. Im Rahmen der ER-assoziierten Degradation werden Proteine vom ER (exoplasmatische Phase) ins Cytosol (plasmatische Phase) transportiert (vgl. Abschnitt 1.3.1.2). Da der ERAD-Translokationsapparat die richtige Orientierung für einen Präproteintransporter der zweiten Plastidenmembran aufweist und damit ein wichtiges Grundkriterium erfüllt, wurde von Sommer et al. postuliert, dass der symbiontenspezifische ERAD-Translokationsapparat relokalisiert und zum Präproteintranslokator der zweiten Plastidenmembran umfunktioniert wurde (Sommer et al, 2007).

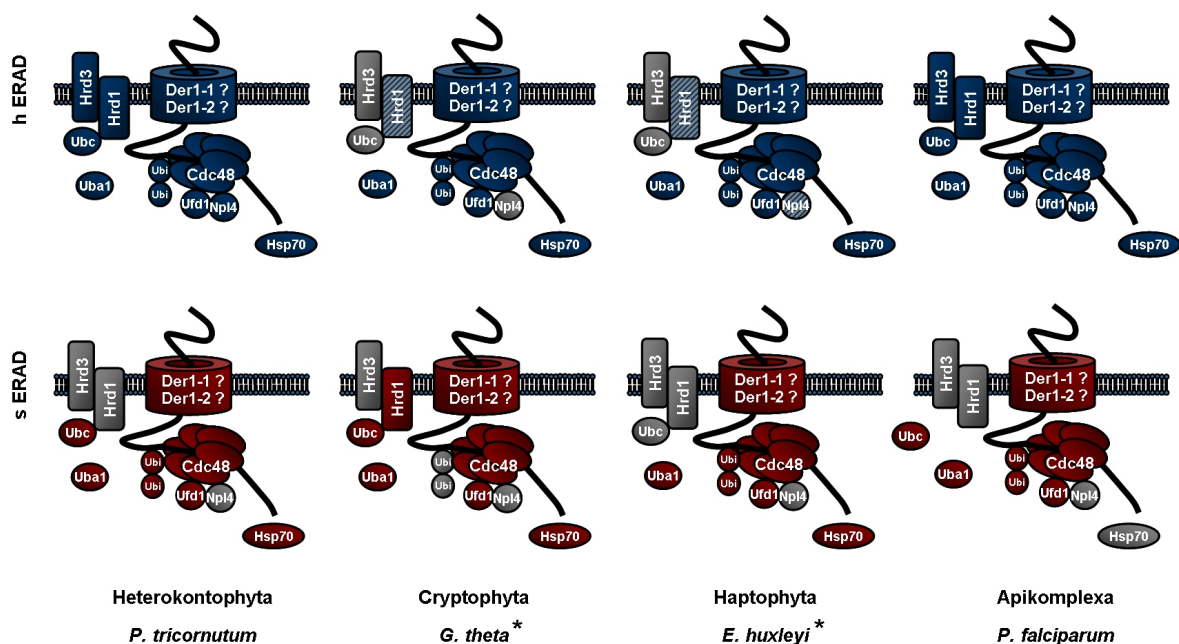


Abb. 1-6: Schematische Darstellung des wirts- und symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates verschiedener Chromalvolaten. Heterokontophyten, Cryptophyten, Haptophyten und Apikomplexe haben zentrale Komponenten des ERAD-Translokationsapparates in einer symbiontenspezifischen Version erhalten (untere Reihe). Komponenten des wirtsspezifischen ERAD-Systems (h ERAD) sind in blau, symbiontenspezifische Faktoren (s ERAD) in rot dargestellt. Grau dargestellte Faktoren wurden bislang nicht identifiziert, während gestreifte Komponenten Kandidaten markieren, für die nur unvollständige Genmodelle existieren. Die Proteinidentifikationsnummern der dargestellten Proteine und weiterer nicht abgebildeter Faktoren sind in Tabelle A-1 im Anhang aufgeführt.

* Datenbanken unvollständig bzw. Assemblierung nicht abgeschlossen.

1.4 Zielsetzung

Viele ökologisch bedeutsame Algengruppen, aber auch beispielsweise humanpathogene Parasiten, wie *Plasmodium falciparum*, sind durch eine sekundäre Endosymbiose entstanden, bei der eine eukaryote Wirtszelle eine Rotalge aufgenommen und als Endosymbiont stabil integriert hat. Im Laufe der Evolution wurde die Rotalge zu einem von vier Membranen umgebenen Organell, einer so genannten komplexen Plastide, reduziert, und ein Großteil der Gene des Symbionten wurde in den Nukleus der Wirtszelle transferiert. Als Konsequenz musste die Zelle neue Transportmechanismen entwickeln, um die entsprechenden Proteine über alle vier Membranen zurück in die Plastide zu transportieren. In den letzten 30 Jahren wurden grundlegende Informationen über den Präproteintransport in die komplexen Plastiden dieser Organismen gesammelt; wie Nukleus-kodierte plastidäre Proteine über die zweite Plastidenmembran transportiert werden, war allerdings lange unklar und wurde ausschließlich auf theoretischer Basis diskutiert.

2007 wurde mittels Datenbank-Analysen gezeigt, dass verschiedene Chromalveolaten zusätzlich zum ERAD (ER-assoziierte Degradation)-System des Wirtes zentrale Komponenten des ERAD-Translokationsapparates in einer symbiontenspezifischen Variante erhalten haben. In der Folge wurde postuliert, dass die Präproteintranslokation an der zweiten Plastidenmembran von Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen möglicherweise durch ein recyceltes ERAD-ähnliches Transportsystem vermittelt wird (Sommer et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Hypothese im Modellsystem *Phaeodactylum tricornutum* experimentell untersucht werden. Ziel ist es, zentrale Komponenten des symbiontenspezifischen ERAD-Systems, wie die Membranproteine sDer1-1 und sDer1-2, zu lokalisieren und zu charakterisieren. Im Speziellen soll dabei untersucht werden, ob das symbiontenspezifische ERAD-System, wie postuliert, in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert ist und tatsächlich ein Zusammenhang zur Präproteintranslokation besteht.

2 Ergebnisse

Die Evolution so genannter komplexer Plastiden, die von drei bzw. vier Hüllmembranen umgeben sind, machte die Entwicklung neuer Transportsysteme notwendig, um Präproteine, die auf dem Nukleus der Wirtszelle kodiert sind, zurück in das komplexe Organell zu transportieren.

Auf dem Genom der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* sind zusätzlich zum wirtsspezifischen ERAD (ER-assoziierte Degradation)-System, verschiedene Faktoren der ERAD-Translokationsmaschinerie in einer symbiontenspezifischen Version kodiert (vgl. Abschnitt 1.3.2). Da das ER des Endosymbionten im Laufe der Evolution aber eliminiert wurde, ist davon auszugehen, dass das System eine essentielle, wenn auch modifizierte Funktion erfüllt, und so wurde 2007 postuliert, dass dieses symbiontenspezifische ERAD-ähnliche Transportsystem eine neue, degradationsunabhängige Funktion ausführt und die Präproteintranslokation an der zweiten Plastidenmembran, der periplastidären Membran (PPM), vermittelt (Sommer et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine des symbiontenspezifischen ERAD-Systems näher charakterisiert und unter dem Aspekt ihrer postulierten Funktion – als Komponenten eines Transportsystems der zweiten Plastidenmembran – genauer untersucht.

2.1 Der symbiontenspezifische Der1-Komplex von *P. tricornutum*

Proteine der Der1 (Degradation at the ER 1)-Familie sind integrale Proteine der ER-Membran und zentraler Bestandteil des ERAD-L Translokationskomplexes (vgl. Abschnitt 1.3.1.2). Das Protein Der1p aus Hefe sowie die Homologen aus dem Säugersystem (Derlin-1, Derlin-2 und Derlin-3) sind essentiell für die Degradation löslicher ERAD-Substrate; die genaue Funktion ist bis heute aber nicht klar. Vielfach wird eine Rolle als kanalbildende Komponente diskutiert (vgl. Abschnitt 1.3.1.2).

In *P. tricornutum* sowie auch in anderen Chromalveolaten werden neben zwei wirtsspezifischen Versionen zwei symbiontenspezifische Varianten des Der1-Proteins

kodiert. Die symbiontenspezifischen Der1-Proteine aus *P. tricornutum* wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit Untersuchungen zur Lokalisation und Topologie der Proteine, der Fähigkeit zur Komplexbildung sowie der Interaktion mit Substratproteinen.

2.1.1 Die symbiontenspezifischen Proteine sDer1-1 und sDer1-2

In *Phaeodactylum tricornutum* existieren zwei Versionen des Der1-Proteins, Der1-1 und Der1-2, die jeweils in einer wirtsspezifischen Variante (hDer1-1 und hDer1-2) und einer symbiontenspezifischen Variante (sDer1-1 und sDer1-2) vorliegen. Die symbiontenspezifischen Varianten besitzen im Gegensatz zu den Versionen des Wirtes eine N-terminale zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für den Transport in das periplastidäre Kompartiment (PPC), das reduzierte Cytosol des Endosymbionten (vgl. Abschnitt 1.2.3). Die maturen Proteine haben eine vorhergesagte Größe von 26-30 kDa und besitzen laut Hydrophobizitätsanalysen (nach TMHMM v2.0) vier Transmembrandomänen bzw. hydrophobe Bereiche sowie eine mit Der1-Proteinen aus Hefe und dem Säugersystem vergleichbare Topologie mit beiden Termini im Cytosol (Abb. 2-1). Die *in silico* Vorhersagen für die Topologie von sDer1-2 sind weniger eindeutig, konnten jedoch z.T. in nachfolgend beschriebenen Experimenten bestätigt werden (vgl. Abschnitt 2.1.2). Ein Alignment der wirtsspezifischen und symbiontenspezifischen Der1-Proteine zusammen mit Der1p aus *S. cerevisiae* ist im Anhang abgebildet (Abb. A-1).

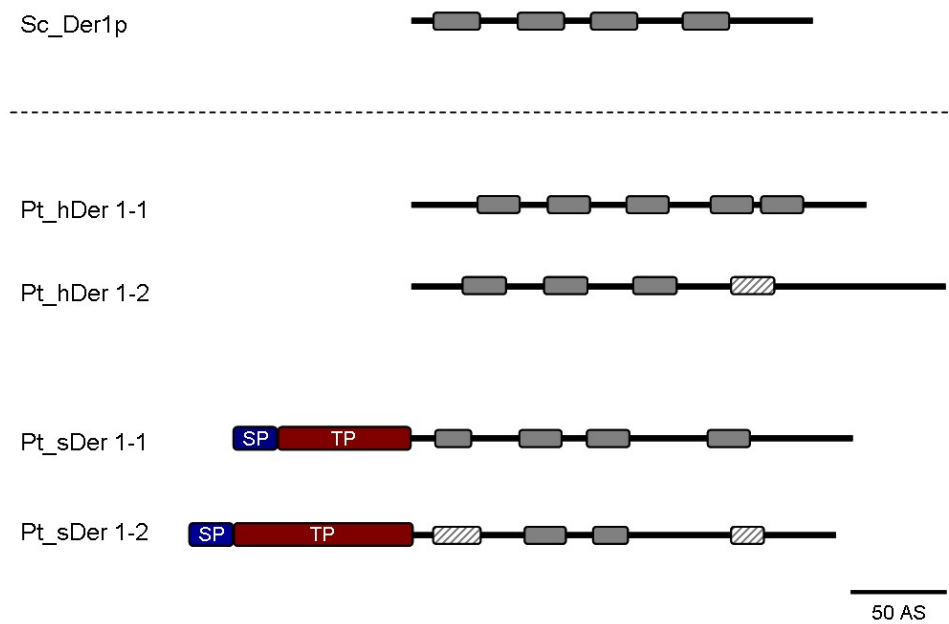


Abb. 2-1: Vergleichende Darstellung von Der1p aus *S. cerevisiae* und wirtsspezifischen sowie symbiontenspezifischen Der1-Proteinen aus *P. tricornutum*. Hydrophobizitätsanalysen postulieren für die vier Der1-Proteine aus *P. tricornutum* eine zu Der1p aus *S. cerevisiae* (Sc_Der1p) vergleichbare Grundstruktur und Topologie. Transmembrandomänen sind in grau, hydrophobe Domänen in grau/weiß dargestellt (nach TMHMM v2.0). Die beiden symbiontenspezifischen Der1-Proteine (Pt_sDer1-1, Pt_sDer1-2) besitzen im Gegensatz zu den wirtsspezifischen Varianten (Pt_hDer1-1, Pt_hDer1-2) eine N-terminale zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment, die aus einem Signalpeptid und einem Transitpeptid besteht. AS – Aminosäuren, SP – Signalpeptid, TP – Transitpeptid.

2.1.2 sDer1-Proteine sind integrale Membranproteine der PPM

Grundvoraussetzung für die postulierte Funktion des symbiontischen ERAD-Apparates als Präproteintranslokator der zweiten Plastidenmembran ist, dass die symbiontenspezifischen Membrankomponenten in der zweiten Plastidenmembran, der periplastidären Membran (PPM), lokalisiert sind. Im Folgenden wurde mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Methoden die Lokalisation der Membranproteine sDer1-1 und sDer1-2 näher untersucht.

Im Unterschied zu den wirtsspezifischen Proteinen tragen die symbiontenspezifischen Der1-Proteine am N-Terminus eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment (PPC) (vgl. Abschnitt 2.2.1). Da es sich laut *in silico* Vorhersagen um integrale Membranproteine handelt, ergeben sich daraus theoretisch drei Möglichkeiten für die Lokalisation dieser symbiontenspezifischen Versionen: i) die

zweite Plastidenmembran (PPM), ii) die dritte Plastidenmembran, iii) bislang unbekannte Membranstrukturen im periplastidären Kompartiment. Um die Lokalisation von sDer1-1 und sDer1-2 in *P. tricornutum* näher zu untersuchen, wurden zunächst GFP-Fusionskonstrukte mit den Proteinen in voller Länge erstellt und in *P. tricornutum* eingebracht. Die Sequenz von eGFP wurde dafür an den C-Terminus der Proteine fusioniert (vgl. Abschnitt 5.2.4). Die Lokalisationsanalysen zeigten für beide sDer1-Proteine eine „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für eine periplastidäre GFP-Lokalisation in *P. tricornutum* typisch ist (Gould et al, 2006a; Gould et al, 2006b) (Abb. 2-2 A, obere und mittlere Reihe). Im Unterschied dazu zeigte das wirtsspezifische Der1-2 Protein (hDer1-2) wie erwartet eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum. Der GFP-Ring der Kernhülle ist im Querschnitt der Zelle gut zu erkennen (Abb. 2-2 A, untere Reihe).

Da die beobachtete GFP-Lokalisation der symbiontenspezifischen Der1-Proteine sich nicht wesentlich von der Lokalisation löslicher periplastidärer GFP-Fusionsproteine unterschied, wurde mittels Carbonatextraktion überprüft, ob es sich bei sDer1-1 und sDer1-2 tatsächlich um integrale Membranproteine handelt, wie es von Der1p aus Hefe und den Derlin-Proteinen des Säugersystems bekannt ist (Hitt & Wolf, 2004; Lilley & Ploegh, 2005). Dazu wurden Membranen aus *P. tricornutum* isoliert und mit Natriumcarbonat gewaschen, um assoziierte Membranproteine abzulösen (vgl. Abschnitt 5.2.3.6). In Einklang mit den zuvor beschriebenen *in silico* Vorhersagen handelt es sich sowohl bei sDer1-1 als auch bei sDer1-2 um integrale Membranproteine, die weder in der Fraktion der löslichen noch in der Fraktion der assoziierten Membranproteine detektiert wurden (Abb. 2-2 B). Weitere Hinweise für die Membranlokalisation beider Proteine lieferten elektronenmikroskopische Analysen. Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen sDer1-1 und sDer1-2 aus *P. tricornutum* wurde an einer der die Plastide umgebenden Membranen Immunogold-Markierung detektiert (Abb. 2-2 C). Da die vier Plastidenmembranen allerdings sehr eng zusammenliegen, war eine genaue Spezifikation der Zielfolienmembran der sDer1-Proteine auch durch elektronenmikroskopische Analysen nicht möglich.

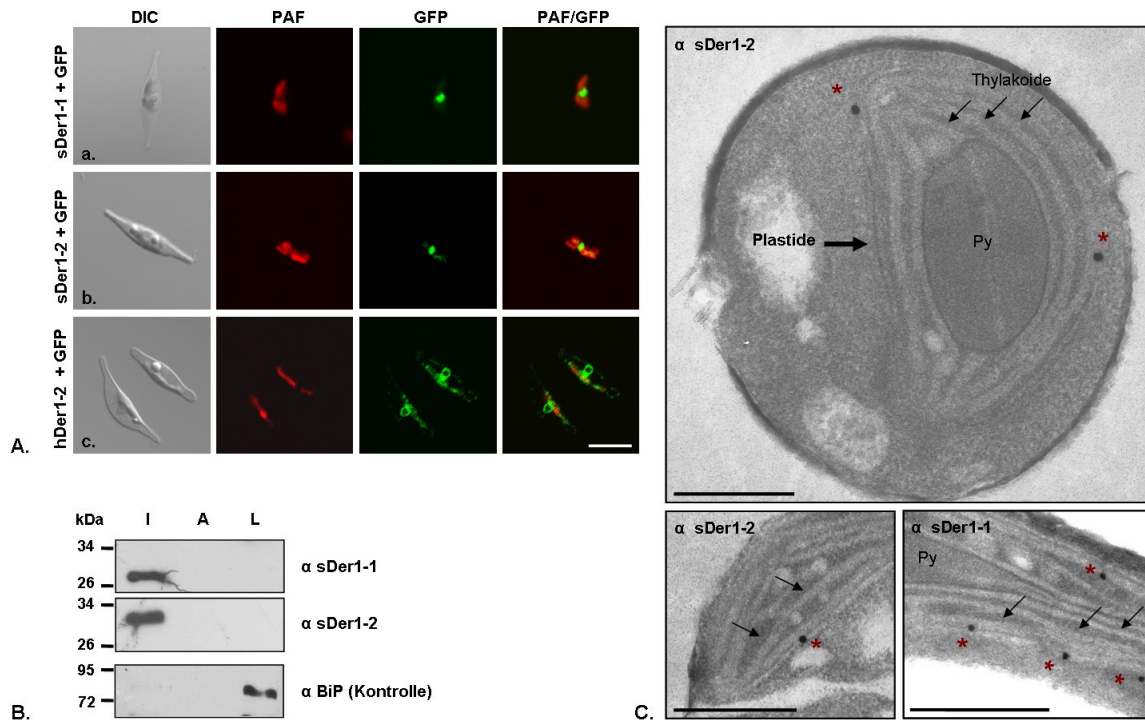


Abb. 2-2: Untersuchungen zur Lokalisation der symbiontenspezifischen Proteine sDer1-1 und sDer1-2 in *P. tricornutum*. **A.** *In vivo* Lokalisationsstudien mit sDer1-1 und sDer1-2 GFP-Fusionskonstrukten zeigen eine „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für das periplastidäre Kompartiment typisch ist (a+b). Das wirtsspezifische hDer1-2 Protein ist hingegen wie erwartet im ER der Zelle lokalisiert (c). Die Plastidenautofluoreszenz ist in rot, GFP-Fluoreszenz in grün dargestellt. Skala = 10 µm **B.** Mittels Carbonatextraktion konnte gezeigt werden, dass sDer1-1 und sDer1-2 integrale Membranproteine sind. Im Westernblot werden beide Proteine ausschließlich in der Fraktion integraler Membranproteine (I), nicht jedoch in der Fraktion assoziierter Membranproteine (A) und löslicher Proteine (L) detektiert. Das lösliche Protein BiP wird in der erwarteten Fraktion detektiert. **C.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen für sDer1-1 und sDer1-2 spezifische Immunogoldmarkierung an einer der vier Plastidenhüllmembranen. Ultradünnschnitte von *P. tricornutum* Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen sDer1-1 und sDer1-2 inkubiert. Goldpartikel (30 nm) sind mit Sternen hervorgehoben. Zur Orientierung sind einige Thylakoidmembranen exemplarisch durch Pfeile markiert. Skala = 500 nm. PAF – Plastidenautofluoreszenz, Py – Pyrenoid (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

Um die Zielmembran der Proteine sDer1-1 und sDer1-2 exakt zu bestimmen, wurde das Self-assembling GFP-System in *P. tricornutum* angewendet, das von Cabantous et al. etabliert und bereits zuvor erfolgreich für die Lokalisation von Membranproteinen genutzt wurde (Cabantous et al, 2005; van Dooren et al, 2008). Beim Self-assembling GFP-System wird der C-terminale β-Strang von GFP (GFP-11) leicht modifiziert und vom Rest des Proteins (GFP1-10) abgespalten, so dass beide GFP-Fragmente für sich keine Fluoreszenz zeigen. Die Fragmente haben jedoch eine sehr hohe Affinität und

assemblieren stabil, sichtbar durch GFP-Fluoreszenz, sobald sie in räumlicher Nähe sind, beispielsweise im selben Kompartiment. Im Zuge der Etablierung des Self-assembling GFP-Systems in *P. tricornutum* wurde deutlich, dass das System sehr sensitiv reagiert und dass eine zu starke Expression der GFP-Konstrukte zur Assemblierung von Transportintermediaten führt und folglich sämtliche Konstrukt-Kombinationen GFP-Fluoreszenz zeigten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die GFP-11 und GFP1-10 Fusionskonstrukte unter einem induzierbaren Promotor für nicht länger als 24 h exprimiert (vgl. Abschnitt 5.2.5).

Für die Lokalisationsstudien der symbiontenspezifischen Der1-Proteine wurde GFP-11 an den C-Terminus der Proteine sDer1-1 bzw. sDer1-2 fusioniert. Das Fragment GFP1-10 wurde an den C-Terminus verschiedener Markerproteine bzw. Zielsteuerungssequenzen fusioniert und dadurch in verschiedene Kompartimente wie das ER oder das PPC dirigiert (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.5). Das Grundprinzip dieses experimentellen Ansatzes ist in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt. Für beide sDer1-Proteine wurde in Kombination mit dem PPC-Marker die typische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz detektiert (Abb. 2-3 A, c+d), während in Kombination mit dem ER-Marker keine Fluoreszenz beobachtet wurde (Abb. 2-3 A, a+b). Das Ergebnis bestätigte folglich die *in silico* Topologie-Vorhersagen und zeigte, dass der C-Terminus beider Proteine im periplastidären Kompartiment lokalisiert ist. Um die Zielmembran beider Proteine exakt zu bestimmen, wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, bei dem beide sDer1-Proteine um die C-terminal vorhergesagte Alpha-helix, die vierte Transmembrandomäne, verkürzt wurden (Abb. 2-3 B) (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.5). Diese verkürzten sDer1-Konstrukte zeigten in Kombination mit dem ER-Marker die klassische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz und wiesen damit die zweite Plastidenmembran (PPM) als Zielmembran beider sDer1-Proteine aus (Abb. 2-3 B, e+f). Auch in Kombination mit dem PPC-Marker wurde für die verkürzten sDer1-Konstrukte GFP-Fluoreszenz detektiert (Daten nicht abgebildet). Die Ergebnisse nachfolgend beschriebener Versuche zeigen jedoch, dass diese Beobachtung mit großer Sicherheit auf Transportintermediate zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 2.1.4). Kontrollexperimente zum Self-assembling GFP-Assay in *P. tricornutum* sind dem Anhang Abbildung A-4 zu entnehmen.

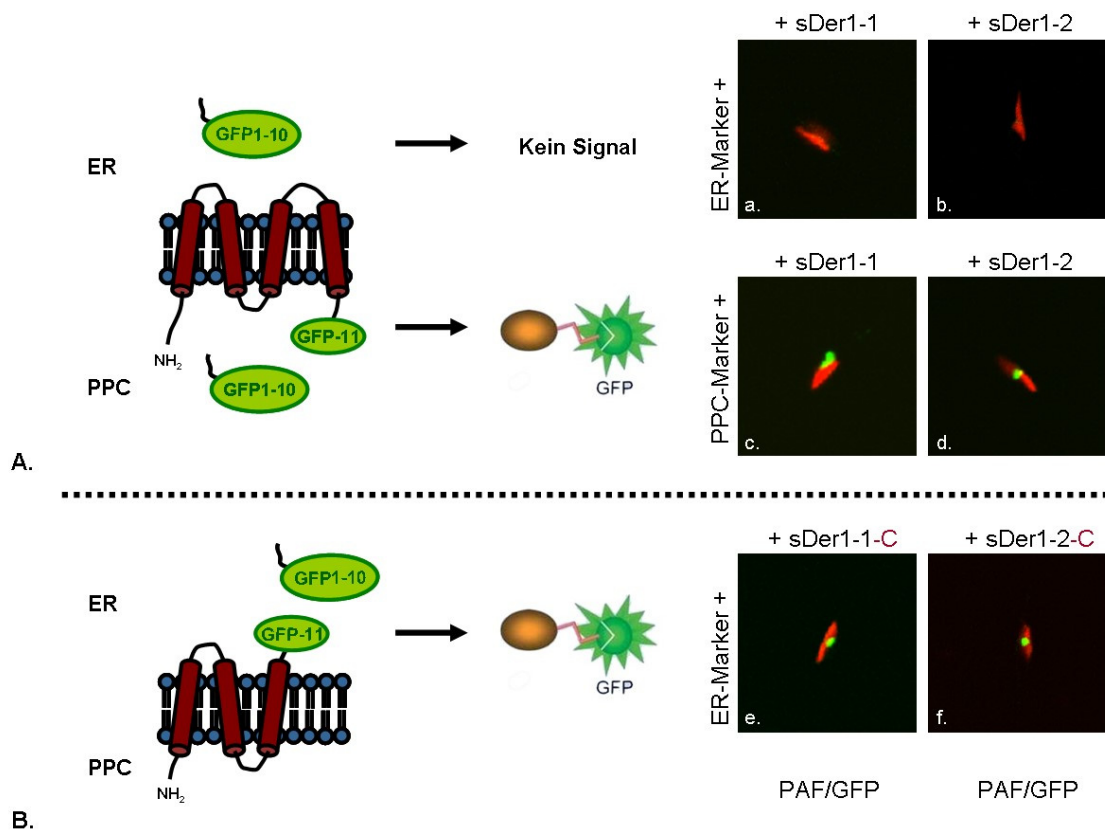


Abb. 2-3: Untersuchungen zur Lokalisation und Topologie von sDer1-1 und sDer1-2 mit Hilfe des Self-assembling GFP-Systems in *P. tricornutum*. Das Prinzip des Self-assembling GFP-Systems beruht darauf, dass GFP in zwei Fragmente gespalten wird (GFP1-10 und GFP1-11), die für sich keine Fluoreszenz zeigen. Wenn beide GFP-Fragmente jedoch zusammen kommen, beispielsweise im selben Kompartiment lokalisiert sind, assemblieren sie stabil, und dies wird durch die daraus resultierende GFP-Fluoreszenz visualisiert. **A.** Zur Untersuchung der Lokalisation und Topologie von sDer1-1 und sDer1-2 wurde das Fragment GFP-11 zunächst an den C-Terminus der volle-Länge Proteine sDer1-1 und sDer1-2 fusioniert. GFP1-10 wurde mit Hilfe verschiedener Zielsteuerungssequenzen entweder ins ER oder ins PPC dirigiert. Da alleine in Kombination mit dem PPC-Marker GFP-Fluoreszenz detektiert wurde (c+d), ließ sich daraus folgern, dass der C-Terminus beider Proteine im PPC lokalisiert ist. **B.** Um die Zielmembran der sDer1-Proteine zu spezifizieren, wurden C-terminal um eine Alphahelix verkürzte sDer1-Varianten (sDer1-1-C/sDer1-2-C) mit GFP-11 fusioniert. Unter Verwendung dieser verkürzten Varianten wurde daraufhin auch in Kombination mit dem ER-Marker die typische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz detektiert (e + f). Beide sDer1-Proteine sind folglich in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert und zeigen eine mit anderen Der1-Proteinen vergleichbare Topologie. PAF – Plastidenautofluoreszenz, PPC – periplastidäres Kompartiment (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

Abschließend konnte durch diese Kombination verschiedener *in vitro* und *in vivo* Systeme gezeigt werden, dass die beiden symbiontenspezifischen Der1-Proteine sDer1-1 und sDer1-2 in der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum* lokalisiert sind. Die C-Termini beider Proteine zeigen zur cytosolischen Seite, dem PPC, und legen damit eine

mit Der1p aus Hefe bzw. den Derlin-Proteinen (Derlin-1, Derlin-2 und Derlin-3) des Säugersystems vergleichbare Topologie nahe. Im Unterschied zu Der1p und den Derlin-Proteinen ist die Zielmembran der symbiontenspezifischen Der1-Proteine allerdings nicht die ER-Membran, sondern die zweite Plastidenmembran, die vermutlich auf die ehemalige Cytoplasmamembran des Symbionten zurückgeht (Cavalier-Smith, 2003). Eine Diskussion dieser Ergebnisse ist Abschnitt 3.1.1 zu entnehmen.

2.1.3 sDer1-1 und sDer1-2 bilden einen oligomeren Komplex in der PPM

Die Funktion des Der1-Proteins aus Hefe bzw. der Homologen aus dem Säugersystem (Derlin-1, Derlin-2 und Derlin-3) ist bislang unklar. Vielfach wird jedoch vermutet, dass die Proteine als kanalbildende Komponenten des ERAD-L Systems fungieren (Lilley & Ploegh, 2005; Wahlman et al, 2007; Ye et al, 2004). Da die Proteine nur ca. 26 kDa groß sind und lediglich vier Transmembrandomänen besitzen (vgl. Abschnitt 2.1.1), ist Oligomerisierung allerdings eine Grundvoraussetzung für die postulierte Funktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch eine Kombination von *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht, ob die symbiontenspezifischen Der1-Proteine aus *P. tricornutum* in einem oligomeren Komplex organisiert sind.

Zunächst wurde mittels Co-Immunopräzipitation untersucht, ob sDer1-1 und sDer1-2 *in vitro* interagieren können (vgl. Abschnitt 5.2.3.7). Dazu wurde der Proteinextrakt einer Kultur verwendet, die das Protein sDer1-2 als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Mit einem Antikörper gegen GFP konnte gezeigt werden, dass zusammen mit dem sDer1-2 GFP-Fusionsprotein auch das endogene sDer1-2 Protein sowie das endogene sDer1-1 Protein immunopräzipitiert werden (Abb 2-4, a). Das Protein sDer1-2 ist demnach *in vitro* in der Lage, Homo-Oligomere zu bilden, kann aber auch mit sDer1-1 interagieren. Auch eine Immunopräzipitation mit einem für sDer1-2 spezifischen Antikörper zeigte, dass sDer1-1 zusammen mit sDer1-2 immunopräzipitiert wird und bestätigte die Bildung von hetero-oligomeren Komplexen (Abb. 2-4, b). Ebenso wurde unter Verwendung von Proteinextrakt einer Kultur, die das sDer1-1 Protein in GFP-Fusion exprimiert, gezeigt, dass das sDer1-1 GFP-Fusionskonstrukt mit dem endogenen sDer1-2 Protein interagieren kann (Abb. 2-4, c). Als Negativ-Kontrolle wurde der Proteinextrakt einer Kultur eingesetzt,

die GFP im Cytosol exprimiert. Mit einem Antikörper gegen GFP wurden weder sDer1-1 noch sDer1-2 immunopräzipitiert (Abb. 2-4, d).

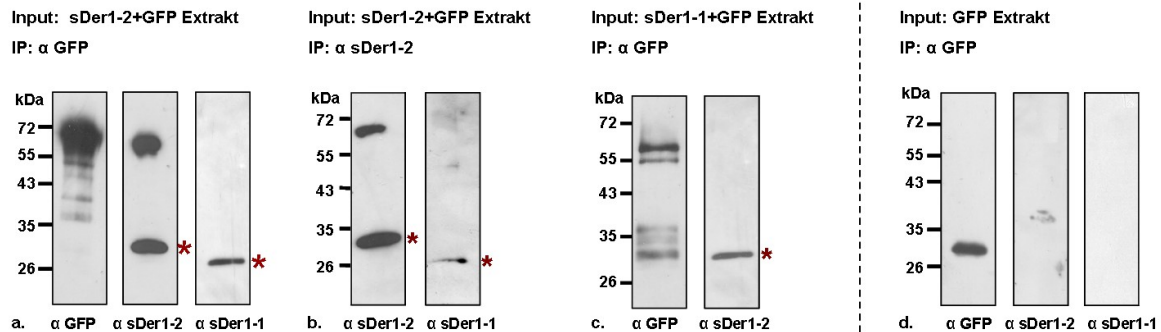


Abb. 2-4: *In vitro* Analysen zur Oligomerisierung der Proteine sDer1-1 und sDer1-2. Mittels Co-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass das Protein sDer1-2 mit sich selbst und mit sDer1-1 interagiert. Unter Verwendung von Proteinextrakt einer Kultur, die ein sDer1-2 GFP-Fusionskonstrukt exprimiert, wurde mit einem Antikörper gegen GFP neben dem GFP-Fusionsprotein (ca. 60kDa) auch das endogene sDer1-2 Protein sowie das endogene sDer1-1 Protein präzipitiert (a.). Signale der endogenen sDer1-Proteine sind durch Sterne markiert. Eine Co-Immunopräzipitation von sDer1-1 und sDer1-2 war auch unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen sDer1-2 erfolgreich (b.). Umgekehrt konnte ebenso mit einem sDer1-1 GFP-Fusionsprotein auch das endogene sDer1-2 Protein präzipitiert werden (c.). Zur Kontrolle wurde Extrakt einer Kultur verwendet, welche GFP im Cytosol exprimiert. GFP alleine zeigte wie erwartet keine Interaktion mit den endogenen sDer1-Proteinen (d). IP – Immunopräzipitation, WB – Westernblot (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert)

Zusätzlich zu den beschriebenen *in vitro* Studien wurde die Oligomerisierung der symbiontenspezifischen Der1-Proteine mit Hilfe des Split-GFP-Systems *in vivo* untersucht. Das Prinzip des Split-GFP-Interaktionssystems beruht darauf, dass GFP in zwei Fragmente gespalten wird, ein N-terminales (N-GFP) und ein C-terminales Fragment (C-GFP). Beide Fragmente können alleine nicht interagieren und zeigen keine Fluoreszenz. Erst durch die Fusion beider Fragmente an zwei miteinander interagierende Proteine werden die GFP-Fragmente nah genug zusammengebracht, um zu assemblieren. Diese Interaktion wird durch die Fluoreszenz von GFP visualisiert (Ghosh et al, 2000; Kerppola, 2006). Eine schematische Darstellung zum Prinzip des Split-GFP-Systems ist in Abbildung 2-5 gezeigt. Um eine Homo-Oligomerisierung von sDer1-1 *in vivo* zu testen, wurde die Sequenz des sDer1-1 Proteins an den N-Terminus beider GFP-Fragmente fusioniert und in *P. tricornutum* exprimiert (Klonierungsstrategie vgl. Abschnitt 5.2.6). Die Zellen zeigten eine charakteristische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für das periplastidäre

Kompartiment typisch ist (Abb. 2-5, a), und bestätigten damit eine Interaktion der sDer1-1 Proteine *in vivo*. Ebenso konnte für die sDer1-2 Proteine eine Homo-Oligomerisierung beobachtet werden (Abb. 2-5, b). Um die Interaktion von sDer1-1 und sDer1-2 *in vivo* zu testen, wurde sDer1-1 in Fusion mit dem N-GFP Fragment und sDer1-2 in Fusion mit dem C-GFP Fragment exprimiert. Auch in dieser Kombination wurde die für das PPC typische GFP-Fluoreszenz beobachtet (Abb. 2-5, c) und somit die Hetero-Oligomerisierung der sDer1-Proteine *in vivo* in *P. tricornutum* nachgewiesen. Als Negativ-Kontrolle wurden beide GFP-Fragmente an die Zielsteuerungssequenzen von sDer1-1 und sDer1-2 fusioniert und dadurch in das periplastidäre Kompartiment dirigiert. Trotz räumlicher Nähe der Fusionskonstrukte wurde keine Interaktion der Fragmente und somit keine Fluoreszenz beobachtet (Abb. 2-5, d). Weitere Positiv- und Negativ-Kontrollen für das Split-GFP-System wurden mit bekannten Protein-Interaktionspaaren aus dem Säugersystem (bFos/bJun-Interaktion) durchgeführt und sind Abbildung A-5 des Anhangs zu entnehmen.

Die hier beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die symbiontenspezifischen Der1-Proteine aus *P. tricornutum* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Homo- und Hetero-Oligomere bilden können. Zusätzlich haben die *in vivo* Studien noch einmal bestätigt, dass die C-Termini beider sDer1-Proteine die gleiche Orientierung aufweisen; ansonsten wäre keine Interaktion der C-terminal fusionierten GFP-Fragmente möglich gewesen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die symbiontenspezifischen Der1-Proteine in einem Komplex organisiert sind und damit eine Grundvoraussetzung für die Bildung eines Translokationskanals erfüllen. Eine ausführliche Diskussion bezüglich dieser Fragestellung ist Abschnitt 3.1.2 zu entnehmen.

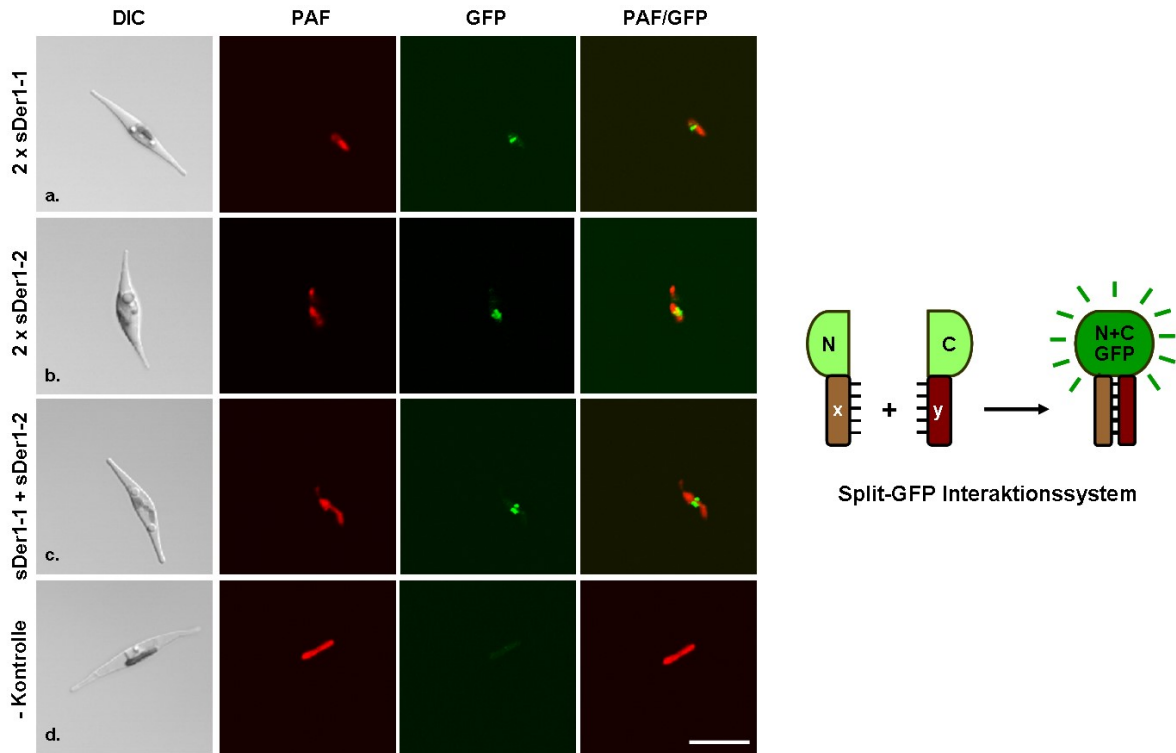


Abb. 2-5: *In vivo* Analysen zur Oligomerisierung der Proteine sDer1-1 und sDer1-2 in *P. tricornutum*. Mit Hilfe des Split-GFP-Interaktionssystems wurde die Oligomerisierung von sDer1-1 und sDer1-2 *in vivo* bestätigt. Das Prinzip dieses Systems beruht darauf, dass GFP in zwei Fragmente (N-GFP und C-GFP) gespalten wird, die alleine nicht interagieren können und keine Fluoreszenz zeigen. Erst durch die Fusion der Fragmente an zwei interagierende Proteine (Protein X und Protein Y, vgl. schematische Darstellung), können N- und C-GFP stabil assemblieren, sichtbar durch GFP-Fluoreszenz. Mit Hilfe des Split-GFP-Systems konnte gezeigt werden, dass sowohl sDer1-1 als auch sDer1-2 Homo-Dimere bilden. Eine „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für das periplastidäre Kompartiment typisch ist, wurde bei Untersuchungen zur Homo-Oligomerisierung von sDer1-1 und sDer1-2 detektiert (a+b). Des Weiteren wurde bestätigt, dass die beiden Proteine in einem hetero-oligomeren Komplex organisiert sind. Jedes sDer1-Protein wurde an ein GFP-Fragment fusioniert. Durch die Interaktion von sDer1-1 und sDer1-2 können die Fragmente assemblieren, wie es durch die GFP-Fluoreszenz sichtbar wird (c). Als Negativ-Kontrolle wurden beide GFP-Fragmente ins PPC dirigiert, wie erwartet zeigte sich hier keine Fluoreszenz/Interaktion. Skala = 10 μ m. PAF –Plastidenautofluoreszenz (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

2.1.4 Der sDer1-Komplex interagiert mit Transitpeptiden periplastidärer Proteine

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Derlin-Proteine aus dem Säugersystem mit ERAD-Substraten interagieren, und in Zusammenhang mit weiteren Beobachtungen wurde daraus vielfach abgeleitet, dass der Der1-Komplex direkt am Retrotranslokationsprozess beteiligt ist (Bernardi et al, 2008; Lilley & Ploegh, 2004; Oda et al, 2006; Wahlman et al, 2007; Ye et al, 2004). Für das symbiontenspezifische ERAD-ähnliche System der Chromalveolaten wurde 2007 eine degradationsunabhängige Rolle bei der Präproteintranslokation an der zweiten Plastidenmembran postuliert (Sommer et al, 2007). Um zu testen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Präproteintranslokation und dem symbiontenspezifischen ERAD-System besteht, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die symbiontenspezifischen Der1-Proteine aus *P. tricornutum* mit einem potentiellen Substrat – den Transitpeptiden plastidärer Proteine – interagieren.

Die Interaktionsstudien erfolgten *in vivo* mit Hilfe des Spit-GFP-Systems, das bereits für die Oligomerisierungsstudien der Der1-Proteine genutzt wurde (vgl. Abschnitt 2.1.3). Gemäß dem Versuchsaufbau wird GFP-Fluoreszenz nur dann detektiert, wenn die symbiontenspezifischen Der1-Proteine mit den jeweils getesteten Zielsteuerungssequenzen interagieren. Für diese Analysen wurde das C-GFP Fragment an den C-Terminus der sDer1-Proteine fusioniert, während die Zielsteuerungssequenzen periplastidärer und stromaler Markerproteine als N-terminale Fusion mit dem N-GFP Fragment exprimiert wurden (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.6). Dabei zeigte sich, dass sowohl sDer1-1 als auch sDer1-2 mit den Transitpeptiden von zwei getesteten periplastidären Proteinen (sHsp70 und sCdc48) interagieren. Für alle Kombinationen wurde die typische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz beobachtet, die für das PPC charakteristisch ist (Abb. 2-6, a-d). Im Weiteren wurden neben PPC-spezifischen Transitpeptiden auch Transitpeptide stromaler Proteine (AtpC und FcpD) getestet. Interessanterweise wurde jedoch für keines der stromalen Transitpeptide eine Interaktion mit dem sDer1-Komplex beobachtet (Abb. 2-6, e-h).

Da das C-GFP Fragment an den C-Terminus der sDer1-Proteine fusioniert wurde und dieser, wie zuvor gezeigt, im PPC lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 2.1.2), konnten im Rahmen dieses Versuchsaufbaus lediglich Interaktionen auf der periplasmatischen Seite detektiert werden. Um potentielle Interaktionen von sDer1-Proteinen und Transitpeptiden auf der ER-Seite zu detektieren, wurden C-terminal um eine Alphahelix verkürzte sDer1-Konstrukte generiert, wie sie bereits in den Topologie-Studien genutzt wurden (vgl. Abschnitt 2.1.2), und an das C-GFP Fragment fusioniert. Mit diesen verkürzten sDer1-Varianten konnte allerdings weder für periplastidäre noch stromale Transitpeptide eine Interaktion beobachtet werden (Daten nicht abgebildet).

Aus den beschriebenen Beobachtungen lassen sich verschiedene Rückschlüsse ziehen, die in Abschnitt 3.1.3 im Detail diskutiert werden. Die Ergebnisse legen aber in jedem Fall nahe, dass in der Tat ein Zusammenhang zwischen dem symbiontenspezifischen ERAD-System und der Präproteintranslokation an der zweiten Plastidenmembran besteht. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass bereits am sDer1-Komplex eine Unterscheidung zwischen periplastidären Proteinen und stromalen Proteinen stattfindet. Dieser Aspekt wurde durch die Mutagenese zweier Transitpeptide näher untersucht, wie es im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

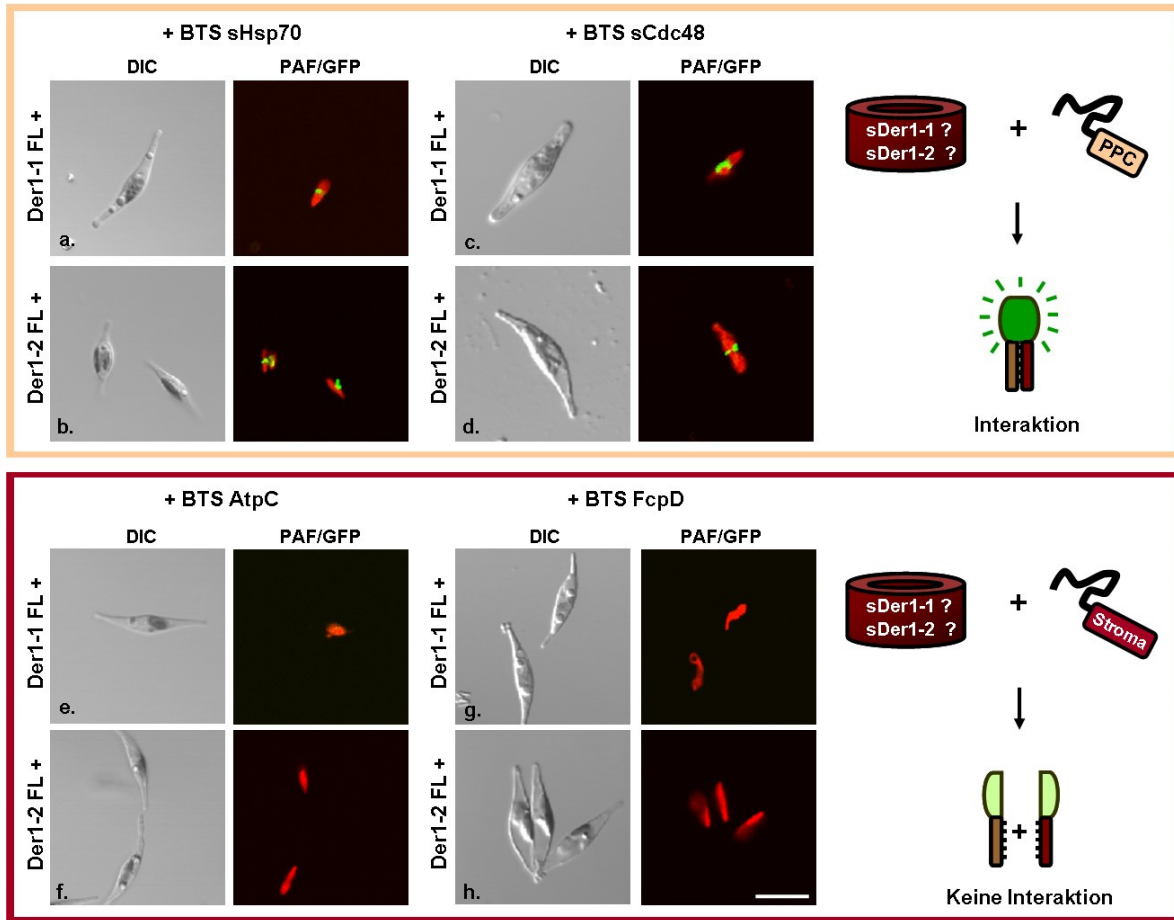


Abb. 2-6: sDer1-1 und sDer1-2 interagieren mit den Transitpeptiden periplastidärer nicht aber stromaler Proteine. Mit Hilfe des Split-GFP-Systems wurde untersucht, ob die symbiontenspezifischen Der1-Proteine sDer1-1 und sDer1-2 mit den Transitpeptiden von periplastidären bzw. stromalen Proteinen interagieren können. Im Fall der Transitpeptide der periplastidären Proteine sHsp70 und sCdc48 wurde GFP-Fluoreszenz und somit -gemäß Versuchsaufbau - eine Interaktion zwischen sDer1-Proteinen und periplastidären Transitpeptiden detektiert (a+b und c+d). Für die Transitpeptide der stromalen Proteine AtpC und FcpD wurde hingegen keine Interaktion mit dem sDer1-Komplex beobachtet, es wurde keine GFP-Fluoreszenz detektiert (e+f und g+h). Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse rechtsseitig schematisch dargestellt. Skala = 10 µm. BTS – *bipartite topogenic signal*, FL – *full length*, PAF – *Plastidenautofluoreszenz*, PPC – *periplastidäres Kompartiment* (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

2.1.5 Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine am sDer1-Komplex

Die Interaktionsstudien mit den symbiontenspezifischen Der1-Proteinen aus *P. tricornutum* haben gezeigt, dass sDer1-1 und sDer1-2 mit Transitpeptiden periplastidärer Proteine interagieren, nicht jedoch mit den Transitpeptiden stromaler Proteine (vgl. Abschnitt 2.1.4). Von Untersuchungen an Heterokontophyten, Cryptophyten und Haptophyten ist bekannt, dass die erste Aminosäure des Transitpeptids eine Schlüsselrolle für die Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine spielt (Gould et al, 2006a; Gould et al, 2006b; Gruber et al, 2007). Während stromale Proteine eine aromatische Aminosäure an +1 Position des Transitpeptids tragen (oder in seltenen Fällen ein Leucin), ist diese Position bei PPC-spezifischen Proteinen mit einer nicht-aromatischen Aminosäure besetzt. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass alleine durch die Mutation dieser +1 Position von einer nicht-aromatischen in eine aromatische Aminosäure ein periplastidäres Protein über alle vier Membranen ins Stroma der Plastide dirigiert werden kann (Gould et al, 2006a).

In weiteren Interaktionstests wurde im Folgenden untersucht, ob die +1 Position des Transitpeptids auch für die Interaktion mit dem symbiontenspezifischen Der1-Komplex eine besondere Rolle spielt. Dafür wurde die +1 Position vom Transitpeptid des stromalen Proteins AtpC von einem Phenylalanin (F) zu einem Alanin (A) mutiert und die Interaktion mit den Proteinen sDer1-1 und sDer1-2 erneut mit Hilfe des Split-GFP-Systems untersucht (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.6). Im Fall dieses mutierten Transitpeptids konnte nun tatsächlich eine Interaktion mit sDer1-1 und auch sDer1-2 beobachtet werden, wie es durch die GFP-Fluoreszenz visualisiert wird (Abb. 2-7, a+b). Umgekehrt wurde bei der Mutation dieser kritischen Position von Alanin zu Phenylalanin, am Beispiel des periplastidären Proteins sHsp70, die Interaktion mit den sDer1-Proteinen gestört. Unter Verwendung dieses mutierten Transitpeptids von sHsp70 wurde keine GFP-Fluoreszenz detektiert (Abb. 2-7, c+d).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die +1 Position des Transitpeptids bei der Interaktion mit dem sDer1-Komplex eine entscheidende Rolle spielt und damit eine Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine bereits an der zweiten Plastidenmembran und

nicht, wie bislang vermutet, alleine an der dritten Plastidenmembran stattfindet. Eine detaillierte Diskussion der Ergebnisse ist Abschnitt 3.1.3 zu entnehmen.

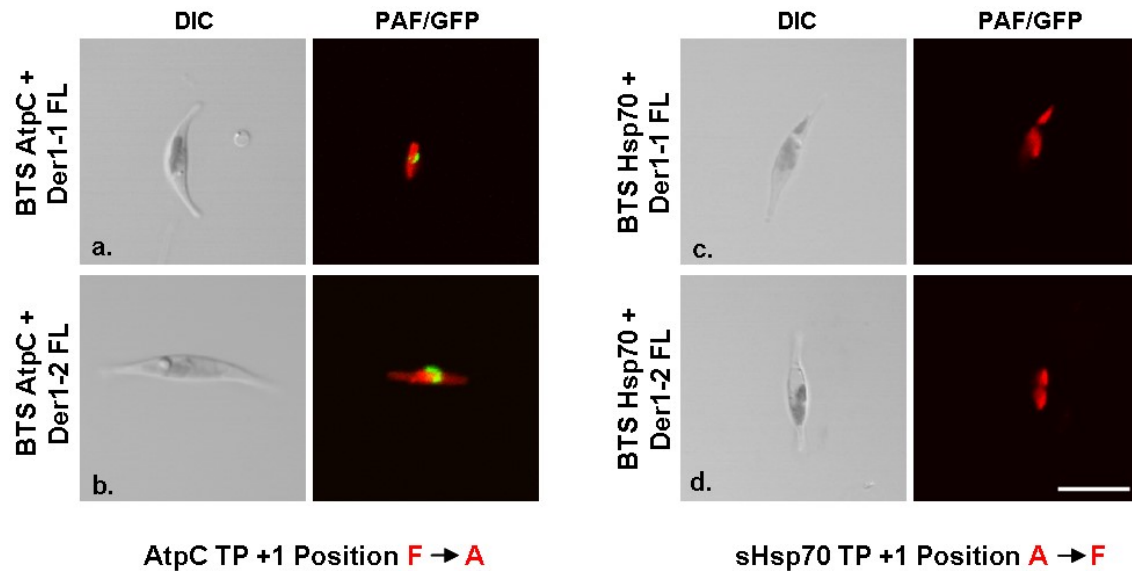


Abb. 2-7: Die +1 Position des Transitpeptids ist kritisch für die Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine am sDer1-Komplex in *P. tricornutum*. Mit Hilfe des Split-GFP-Interaktionssystems wurde untersucht, ob die +1 Position des Transitpeptids, die ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für periplastidäre und stromale Proteine ist, auch eine Rolle bei der Interaktion mit dem sDer1-Komplex spielt. Dabei zeigte sich, dass bei dem stromalen Protein AtpC, dessen Transitpeptid zuvor nicht mit dem sDer1-Komplex interagiert hat, die Mutation dieser Position von einem Phenylalanin (F) zu einem Alanin (A) zu einer Interaktion mit den sDer1-Proteinen führte. Visualisiert wird dies beim Split-GFP-System durch die GFP-Fluoreszenz (a+b). Umgekehrt wurde im Fall des periplastidären Proteins sHsp70 die +1 Position von einem Alanin zu einem Phenylalanin mutiert. Interessanterweise konnte für dieses periplastidäre Transitpeptid nun keine GFP-Fluoreszenz mehr beobachtet werden (c+d). Offensichtlich verhindert die eingeführte Mutation die Interaktion mit dem sDer1-Komplex. Skala = 10 µm. BTS – *bipartite topogenic signal*, FL – *full-length*, TP – *Transitpeptid* (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

2.2 Die symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 von *P. tricornutum*

RING-Finger Ubiquitin-Ligasen bilden zentrale Komponenten des ERAD-Systems und sind essentiell für die Degradation aller Typen von ERAD-Substraten. Bereits während des Translokationsprozesses katalysiert die Ubiquitin-Ligase (E3-Enzym) den Transfer von Ubiquitinmolekülen auf das Substrat, so dass dieses von der ubiquitinabhängigen ATPase Cdc48 gebunden und unter Energieverbrauch ins Cytosol transportiert wird (vgl. Abschnitt 1.3.1). Beim ERAD-L und ERAD-M System erfolgt die Substratubiquitinierung durch die Ubiquitin-Ligase Hrd1, deren Funktion nicht nur für die Degradation, sondern bereits für den Retrotranslokationsprozess essentiell ist (Bordallo et al, 1998; Garza et al, 2009).

Für das symbiontenspezifische ERAD-ähnliche System der Chromalveolaten wurde postuliert, dass es eine degradationsunabhängige Rolle einnimmt und eine Funktion als Präproteintranslokator der zweiten Plastidenmembrane erfüllt (Sommer et al, 2007). Sollte der Translokationsapparat dieses Systems funktionell dem genuinen ERAD-System entsprechen, würde man davon ausgehen, dass eine Ubiquitin-Ligase auch im Fall des symbiontenspezifischen Systems einen essentiellen Bestandteil des Translokationskomplexes bildet. Da Hrd1-Proteine allerdings im Allgemeinen sehr schlecht konserviert sind, gelang es bislang nicht, symbiontenspezifische Versionen des Proteins in anderen Chromalveolaten als den Cryptophyten zu identifizieren (Sommer et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase in *P. tricornutum* identifiziert und näher charakterisiert. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit Untersuchungen zur Funktionalität und Lokalisation dieses Enzyms.

2.2.1 Data-Mining: Kandidaten für eine symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase

Die Ubiquitin-Ligase Hrd1p aus *S. cerevisiae* ist ein etwa 63 kDa großes Protein der ER-Membran mit einer C-terminalen cytosolischen RING-H2-Domäne, die den Transfer von Ubiquitinmolekülen auf verschiedene ERAD-Substrate katalysiert (Bays et al, 2001; Deak

& Wolf, 2001). Abgesehen von der katalytischen RING-Domäne ist der restliche Teil des Proteins nur sehr schwach konserviert. Hrd1-Proteine aus verschiedenen Organismen zeigen keine Homologie in diesen Bereichen; gemeinsam ist ihnen lediglich eine Anzahl von bis zu sechs Transmembrandomänen in der N-terminalen Region.

Auf Grund der schwachen Konservierung war die Suche nach einer symbiontenspezifischen Variante des Hrd1-Proteins unter Standard-BLAST-Einstellungen in *P. tricornutum* nicht erfolgreich – es wurde lediglich die wirtsspezifische Variante von Hrd1 identifiziert (Sommer et al, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *P. tricornutum* Datenbank unter bestimmten Kriterien manuell nach einer potentiell symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase durchsucht. Suchkriterien waren in Anlehnung an die Grundstruktur von Hrd1-Proteinen i) eine C-terminale RING-H2-Domäne, ii) mindestens eine vorhergesagte Transmembrandomäne, iii) eine Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment. Dabei wurden drei potentielle Kandidaten identifiziert (PhatrDBv2.0 ID: 46465, ID: 36427 und ID: 48034), deren Lokalisation mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten in *P. tricornutum* untersucht wurde. Zwei der Proteine zeigten eine Lokalisation im Cytosol, möglicher Weise auch im ER der Zelle, während der dritte Kandidat (ID: 48034) – nachfolgend s-E3 genannt – im PPC lokalisierte (vgl. Abschnitt 2.2.3, Abb 2.9) und näher untersucht wurde.

2.2.2 Das Protein s-E3

Das Protein s-E3 von *P. tricornutum* ist ca. 59 kDa groß und besitzt somit ein mit Hrd1p aus *S. cerevisiae* (63.5 kDa) vergleichbares Molekulargewicht. Nahe dem C-Terminus liegt eine konservierte RING-H2-Domäne, wie sie für RING-Finger Ubiquitin-Ligasen charakteristisch ist (Abb. 2-8 B). Im Gegensatz zu Hrd1p aus *S. cerevisiae* und Homologen aus anderen Organismen wird für s-E3 lediglich eine Transmembrane vorhergesagt (nach SOSUIv1.11). Diese befindet sich ca. 70 Aminosäuren vor der RING-Domäne und liegt damit in einer Region, in der sich bei Hrd1-Proteinen in etwa die letzte der meist sechs Transmembrandomänen befindet (Abb. 2-8 A). Am N-Terminus besitzt s-E3 eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment. Während das Signalpeptid klar vorhergesagt wird (SignalPv3.0), ist dies für das Transitpeptid im Rahmen von *in silico* Analysen nicht eindeutig möglich. Die Funktionalität der

zweigeteilten Zielsteuerungssequenz wurde experimentell durch *in vivo* Lokalisationsstudien nachgewiesen (vgl. Abschnitt 2.2.3).

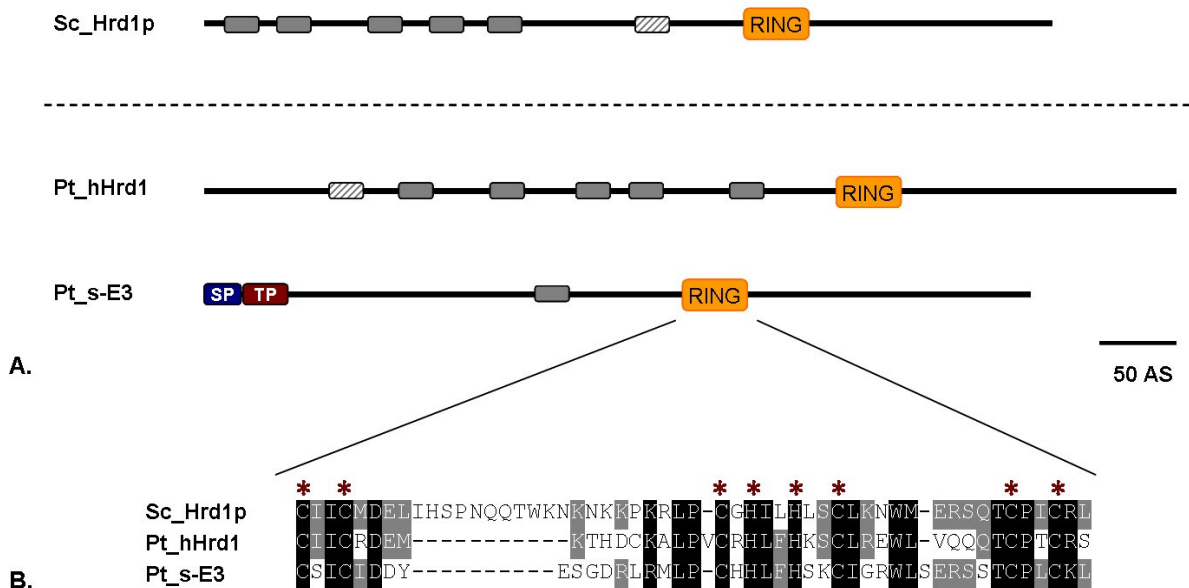


Abb. 2-8: A. Schematische Darstellung von Hrd1p aus *S. cerevisiae*, dem wirtsspezifischen Hrd1-Protein aus *P. tricornutum* und der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3. A. Die konservierte RING-H2-Domäne ist orange markiert; Transmembrandomänen sind grau, hydrophobe Regionen grau/weiß dargestellt (nach SOSUIv1.11 und TMHMMv2.0). Hydrophobizitätsanalysen sagen für Hrd1p aus *S. cerevisiae* (Sc_Hrd1p) sowie für das wirtsspezifische Hrd1-Protein (Pt_hHrd1) sechs Transmembrandomänen bzw. hydrophobe Bereiche vorher. Die symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 (Pt_s-E3) besitzt laut *in silico* Vorhersagen eine Transmembrandomäne. Am N-Terminus trägt s-E3 eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment. (Die Länge des Transitpeptids ist unbekannt und entspricht nicht dem Maßstab der übrigen Darstellung). **B. Alignment der RING-Domäne von Hrd1p aus *S. cerevisiae* und hHrd1 sowie s-E3 aus *P. tricornutum*.** Bei allen drei Proteinen handelt es sich um RING-H2-Domänen mit zwei zentralen Histidinen. Konservierte Cysteine und Histidine des C₃H₂C₃-Motivs sind hervorgehoben. AS – Aminosäuren, SP – Signalpeptid, TP – Transitpeptid.

2.2.3 s-E3 ist ein symbiontenspezifisches Membranprotein mit katalytischer Funktion im PPC

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten (Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2) vorweggenommen wurde, haben *in vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum* gezeigt, dass es sich bei s-E3 um ein symbiontenspezifisches Protein handelt. GFP-Fusionskonstrukte mit dem s-E3 Protein in voller Länge zeigten eine typische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für das periplastidäre Kompartiment charakteristisch ist (Abb. 2-9 A). Laut *in silico* Vorhersagen ist s-E3 ein integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne

(vgl. Abschnitt 2.2.2). Um dies experimentell zu prüfen, wurden integrale Membranproteine von assoziierten Membranproteinen mittels Carbonatextraktion getrennt. Im anschließenden Westernblot konnte s-E3 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers dominant in der Fraktion integraler Membranproteine nachgewiesen werden, während das lösliche Protein BiP, wie erwartet, allein in der Fraktion der löslichen Proteine detektiert wurde (Abb. 2-9 B). Weitere Hinweise für eine Membranlokalisierung von s-E3 lieferten elektronenmikroskopische Analysen. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen s-E3 wurde Immunogold-Markierung an einer der vier Plastidenhüllmembranen detektiert (Abb. 2-9 C).

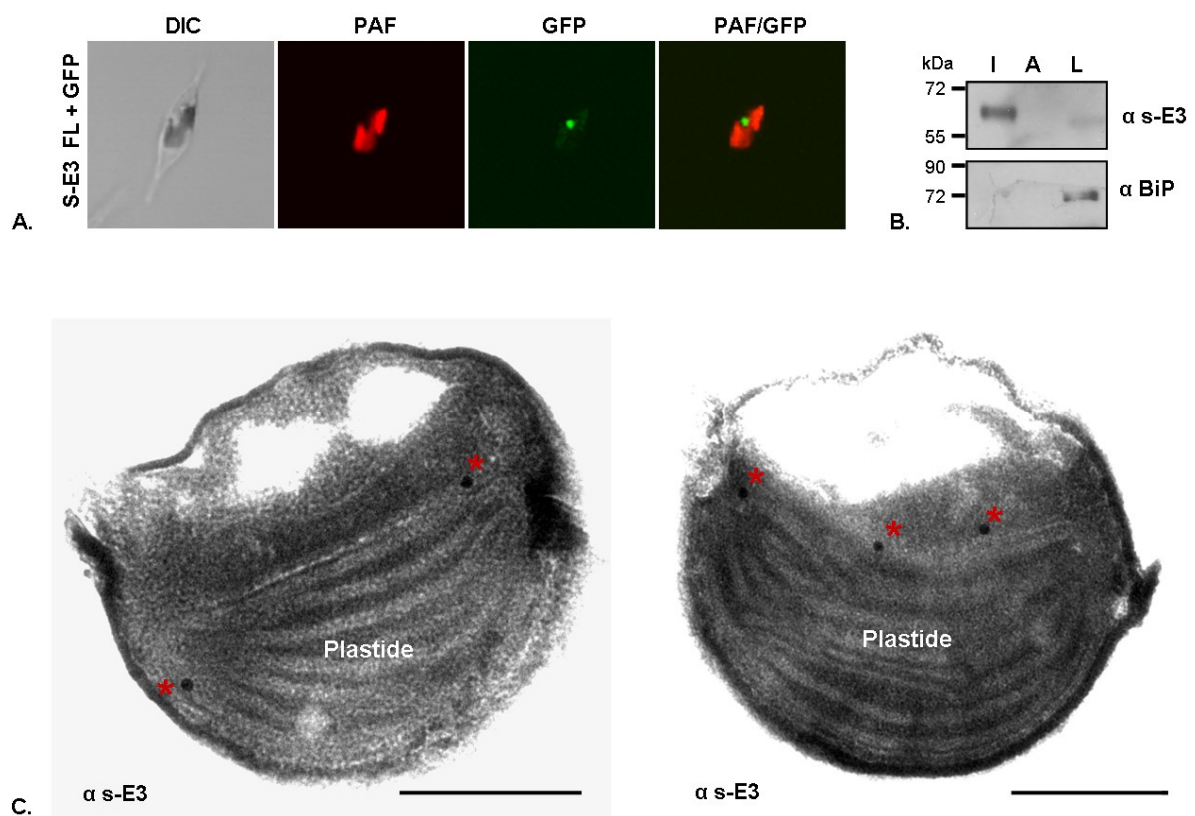


Abb. 2-9: Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins s-E3 in *P. tricornutum*. **A.** Das volle-Länge Protein s-E3 zeigt als GFP-Fusionskonstrukt eine „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz, wie sie für periplastidäre Proteine typisch ist. **B.** Mittels Carbonatextraktion konnte gezeigt werden, dass s-E3 ein integrales Membranprotein ist. Im Westernblot wird s-E3 in der Fraktion integraler Membranproteine (I) und nicht in den Fraktionen assoziierter Membranproteine (A) und löslicher Proteine (L) detektiert. Zur Kontrolle dient das lösliche Protein BiP, das wie erwartet ausschließlich in der Fraktion löslicher Proteine (L) vorkommt. **C.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von s-E3 zeigen spezifische Immunogold-Markierung an einer der Plastidenhüllmembranen von *P. tricornutum*. Goldpartikel (30 nm Goldpartikel) sind mit Sternen hervorgehoben. Skala = 500 nm FL – full length, PAF – Plastidenautofluoreszenz

Da die Membranen sehr nah zusammenliegen, war eine exakte Spezifizierung der Zielmembran von s-E3 mittels elektronenmikroskopischer Analysen nicht möglich. Um die Lokalisation und Topologie von s-E3 genauer zu untersuchen, wurde – ebenso wie bei den Lokalisationsstudien zu den symbiontenspezifischen Der1-Proteinen (vgl. Abschnitt 2.1.2) – das Self-assembling GFP-System genutzt, das darauf beruht, dass GFP-Fluoreszenz nur dann detektiert wird, wenn beide GFP-Fragmente im selben Kompartiment lokalisiert sind. Dazu wurde das Fragment GFP-11 an den C-Terminus von s-E3 fusioniert und in Kombination mit dem Fragment GFP1-10 exprimiert, welches mit Hilfe verschiedener Zielsteuerungssequenzen entweder ins PPC oder ins ER dirigiert wurde (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.5). Abbildung 2-10 zeigt eine schematische Darstellung dieses experimentellen Ansatzes. Dabei zeigte sich in Kombination mit dem PPC-Marker die klassische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz (Abb. 2-10, b), während keine GFP-Fluoreszenz in Kombination mit dem ER-Marker detektiert wurde (Abb. 2-10, a). Bezüglich der Topologie von s-E3 lässt sich daraus ableiten, dass der C-Terminus mit der katalytischen RING-Domäne im PPC, also auf der plasmatischen Seite liegt, wie es auch bei Hrd1-Proteinen der Fall ist. Diese Orientierung ist essentiell für die postulierte Funktion von s-E3 als Ubiquitin-Ligase eines ERAD-ähnlichen Präproteintransporters der zweiten Plastidenmembran und wird in diesem Zusammenhang ausführlicher in Abschnitt 3.1.4 diskutiert.

Die Lokalisation von s-E3 wurde damit auf die zweite bzw. dritte Plastidenmembran eingeschränkt. Im Fall einer Lokalisation in der zweiten Plastidenmembran, sollte der N-Terminus von s-E3 im ER-Lumen liegen, da das Protein laut Topologie-Vorhersage nur eine Transmembrandomäne besitzt und der C-Terminus – wie zuvor gezeigt – im PPC liegt. Um die Zielmembran näher zu spezifizieren, wurde im Weiteren ein Self-assembling GFP-Konstrukt erstellt, bei dem das Fragment GFP-11 im N-terminalen Bereich hinter der Zielsteuerungssequenz inseriert wurde und damit auf der exoplasmatischen Seite liegen sollte (vgl. Klonierungsstrategie Abschnitt 5.2.5). In Kombination mit dem ER-Marker wurde für dieses Konstrukt zwar GFP-Fluoreszenz detektiert, allerdings nicht als „Blob“-artige Fluoreszenz, wie es für die C-terminal verkürzten sDer1-Proteine in Kombination mit dem ER-Marker beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 2.1.2), sondern als ER-ähnliche GFP-Fluoreszenz (Abb. 2-10, c), wie es für ER-Membranproteine oder lumenale ER-Proteine

typisch ist. Da vorherige Versuche die zweite oder dritte Plastidenmembran als Zielmembran ausgewiesen haben, ist zu vermuten, dass die Insertion des GFP-Fragments im N-terminalen Bereich von s-E3 die Integration in die zweite Plastidenmembran verhindert und das Fusionsprotein somit im ER verbleibt. Auch wenn damit eine Lokalisation von s-E3 in der zweiten Plastidenmembran wahrscheinlich ist, kann die Zielmembran im Rahmen der Untersuchungen nicht eindeutig spezifiziert werden. Wie in Abschnitt 3.1.4 ausführlicher diskutiert wird, sprechen jedoch auch theoretische Überlegungen gegen eine Lokalisation in der dritten Plastidenmembran und legen eine Lokalisation von s-E3 in der periplastidären Membran (PPM) nahe.

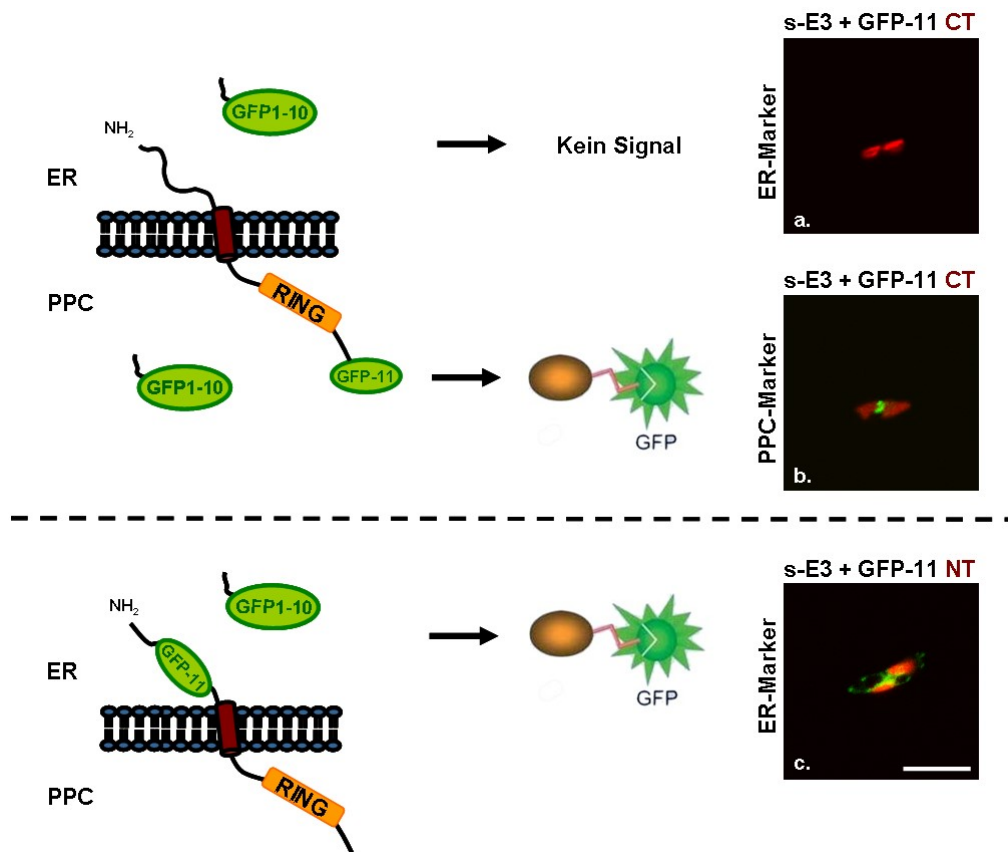


Abb. 2-10: *In vivo* Untersuchungen zur Topologie und Lokalisation von s-E3 in *P. tricornutum*. Unter Verwendung des Self-assembling GFP-Systems konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von s-E3 und damit auch die katalytische RING-Domäne auf der periplasmatischen Seite liegt. Nur in Kombination mit dem PPC-Marker (b), nicht aber in Kombination mit dem ER-Marker wurde GFP-Fluoreszenz beobachtet (a). Durch die Insertion des Fragments GFP-11 im N-terminalen Bereich wurde GFP-Fluoreszenz auch in Kombination mit dem ER-Marker detektiert (c). An Stelle der erwarteten „Blob“-artigen GFP-Fluoreszenz handelt es sich allerdings um eine ER-ähnliche Fluoreszenz, die nahe legt, dass das Fusionskonstrukt nicht korrekt in die Membran integriert wurde. Skala = 10 µm. CT – C-terminal, NT – N-terminal, PPC – periplastidäres Kompartiment.

2.2.4 s-E3 ist eine funktionelle RING-Finger Ubiquitin-Ligase

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass das Protein s-E3 aus *P. tricornutum* ein symbiontenspezifisches Membranprotein ist, das vermutlich in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert ist. Laut *in silico* Vorhersagen besitzt s-E3 in der C-terminalen Region eine RING-Domäne, wie sie für viele Ubiquitin-Ligasen charakteristisch ist (vgl. Abschnitt 2.2.2). Topologiestudien haben zudem bereits belegt, dass diese vorhergesagte Domäne auf der periplasmatischen Seite liegt - eine Voraussetzung für die postulierte Funktion als E3-Enzym des symbiontenspezifischen ERAD-Systems (vgl. Abschnitt 2.2.3).

Um zu testen, ob es sich bei dem Protein s-E3 um eine funktionelle Ubiquitin-Ligase handelt, wurden *in vitro* Ubiquitinierungsexperimente durchgeführt. Verschiedene Ubiquitin-Ligasen wie auch Hrd1p aus *S. cerevisiae* katalysieren in einem solchen *in vitro* System die Selbstubiquitinierung (Bays et al, 2001; Deak & Wolf, 2001; Joazeiro & Weissman, 2000). Dabei bindet die Ligase ein E2-Enzym, das Ubiquitin über einen Thioester gebunden hat, und katalysiert den Transfer des Ubiquitinmoleküls auf ein Substrat bzw. bindet Ubiquitin selbst, wenn weitere Prozesse nicht ablaufen können. Für diese Tests wurde zum einen das volle-Länge Protein s-E3, zum anderen speziell der die RING-Domäne beinhaltende C-terminale Teil von s-E3 als GST-Fusionskonstrukt in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (vgl. Abschnitt 5.2.3.5). Die GST-Fusionsproteine wurden anschließend direkt für die Ubiquitinierungsreaktion eingesetzt (vgl. Abschnitt 5.2.7).

In den Ubiquitinierungsanalysen zeigte sich, dass sowohl das volle-Länge Protein s-E3 (FL), als auch nur der C-terminale Teil mit der katalytischen RING-Domäne (CT) *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität besitzen. In beiden Fällen wurden im Westernblot starke Signale für die ubiquitinierten Fusionsproteine detektiert (Abb. 2-11 A, Spuren 1+2). In den Negativ-Kontrollen wurde aufgereinigtes GST-Protein (ohne Fusionskonstrukt) eingesetzt bzw. ein Reaktionsansatz ohne E2-Enzym inkubiert. Wie erwartet, wird hier keine Ubiquitinierung beobachtet. Weder ist GST alleine zur Selbstubiquitinierung in der Lage, noch kann die Reaktion ohne ein Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym ablaufen (Abb. 2-11 A, Spuren 3+4). Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigen somit, dass es sich bei dem symbiontenspezifischen Protein s-E3 aus *P. tricornutum* um eine funktionelle Ubiquitin-Ligase handelt. Die im C-terminalen Bereich vorhergesagte RING-H2-Domäne ist dabei für

die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich. Eine potentielle Rolle von s-E3 im Rahmen des symbiontenspezifischen ERAD-Systems wird in Abschnitt 3.1.4 ausführlich diskutiert.

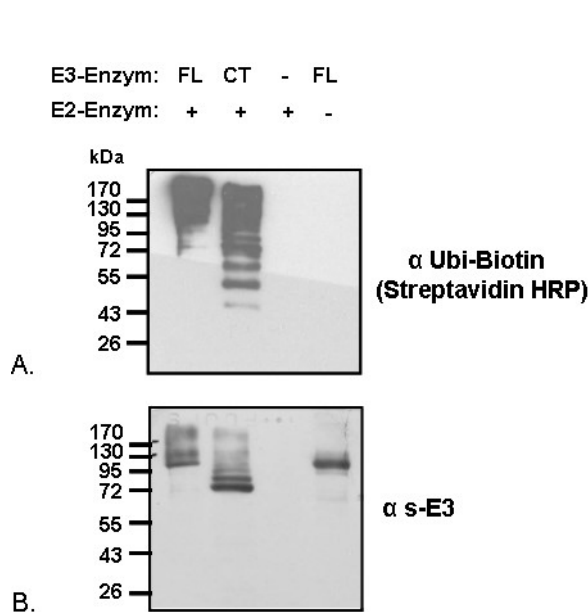


Abb. 2-11: Untersuchungen zur *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität von s-E3 und der RING-H2-Domäne im Speziellen. **A.** *In vitro* Ubiquitinierungsanalysen bestätigen die Funktionalität von s-E3 als Ubiquitin-Ligase. Das volle-Länge Protein s-E3 (FL), sowie die C-terminale RING-Domäne (CT) besitzen die Fähigkeit zur Selbstubiquitinierung und zeigen im Westernblot ein deutliches Ubiquitinierungsmuster (Spuren 1+2). Die Negativ-Kontrollen mit GST an Stelle des Fusionsproteins (Spur 3) bzw. ohne E2-Enzym (Spur 4) zeigen keine Ubiquitinierungsaktivität. **B.** Ladekontrolle für das Protein s-E3. Der s-E3 Antikörper ist gegen den C-Terminus gerichtet und erkennt FL-Konstrukt (Spur 1+4) und CT-Konstrukt (Spur 2).

2.2.5 s-E3 - Kandidaten in anderen Chromalveolaten

In Chromalveolaten wurden unter Standard-BLAST-Einstellungen neben den wirtsspezifischen Hrd1-Proteinen keine weiteren potentiell symbiontenspezifischen Hrd1-Proteine identifiziert. Eine Ausnahme bilden hier allerdings die Cryptophyten, die auf dem Nukleomorph für ein putatives Hrd1-Homolog kodierten (Lane et al, 2007; Sommer et al, 2007) und nahe legen, dass auch andere Chromalveolaten ein symbiontenspezifisches Äquivalent besitzen. Wie bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben wurde, sind Hrd1-Proteine nur sehr schwach konserviert; zudem ist unklar, inwieweit die symbiontenspezifischen Proteine – abgesehen von ihrer Funktion als Ubiquitin-Ligase – konserviert sind. Aus diesem Grund wurde in einem allgemeinen Ansatz unter den in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Kriterien nach potentiell symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligasen in Datenbanken anderer Chromalveolaten gesucht. In *P. tricornutum* wurde dabei das symbiontenspezifische Protein s-E3 identifiziert, das, wie in den

vorherigen Abschnitten beschrieben, als funktionelle symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase charakterisiert werden konnte.

Die Suche nach symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligasen in Datenbanken anderer Chromalveolaten wie *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* und *Emiliana huxleyi* zeigt, dass möglicherweise auch in diesen Organismen potentielle Kandidaten für symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligasen existieren. Für weitere Analysen müssten allerdings auch diese Kandidaten zunächst *in vivo* lokalisiert werden, da *in silico* Vorhersagen im Falle dieser schlecht konservierten Proteine wenig Aussagekraft besitzen.

In *Thalassiosira pseudonana*, einer weiteren Diatomee, kann hingegen mit einiger Sicherheit ein zu s-E3 homologes Protein identifiziert werden. Der Kandidat (ThapsDBv3.0 ID: 25775) zeigt konservierte Bereiche im Vergleich zu s-E3 aus *P. tricornutum* (vgl. Alignment im Anhang, Abbildung A-2) und trägt laut *in silico* Analysen eine N-terminale Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment. Für das Protein aus *T. pseudonana* wird eine vergleichbare Grundstruktur wie für s-E3 aus *P. tricornutum* vorhergesagt. So besitzt das Protein eine vorhergesagte Transmembrandomäne, in etwa in der gleichen Region wie bei s-E3 aus *P. tricornutum*, sowie die konservierte RING-H2-Domäne im C-terminalen Bereich (Abb. 2-12). Die symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 ist somit zumindest in Diatomeen ein konserviertes Protein.

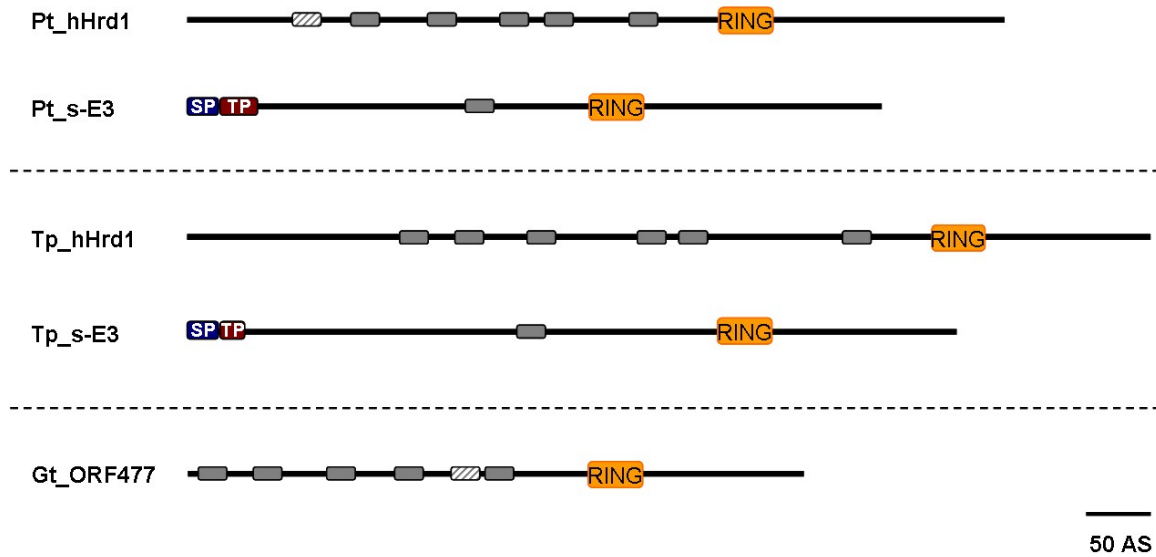


Abb. 2-12: Vergleichende Darstellung wirtsspezifischer Hrd1-Proteine und der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligasen s-E3 aus *P. tricornutum* und *T. pseudonana*. Die in *P. tricornutum* identifizierte symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 (Pt_s-E3) ist vermutlich auch in anderen Diatomeen konserviert. In *T. pseudonana* wurde mittels *in silico* Analysen ein Kandidat mit vergleichbarer Grundstruktur und einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz für das perioplastidäre Kompartiment identifiziert (Tp_s-E3). Für beide Proteine werden im Vergleich zu dem symbiontenspezifischen Kandidaten der Cryptophyte *Guillardia theta* (Gt_ORF477) und den wirtsspezifischen Proteinen aus *P. tricornutum* und *T. pseudonana* (Pt_hHrd1 und Tp_hHrd1) aber nur eine an Stelle von sechs Transmembrandomänen (in grau) bzw. hydrophobe Regionen (in grau/weiß) vorhergesagt (nach SOSUIv1.11 und TMHMMv2.0).

3 Diskussion

Viele ökologisch relevante Algen, wie die Gruppe der Diatomeen, die etwa $\frac{1}{5}$ des globalen Kohlenstoffs fixieren, aber auch beispielsweise humanpathogene Parasiten, wie *Plasmodium falciparum*, sind im Zuge einer sekundären Endosymbiose entstanden und besitzen so genannte komplexe Plastiden. Vergleichbar mit der Etablierung primärer Zellorganelle ging die Integration und Reduktion des Endosymbionten mit komplexen zellulären Anpassungen einher. So wurde ein Grossteil der Gene des Symbionten eliminiert bzw. in den Nukleus des Wirtes transferiert, und folglich mussten neue Transportmechanismen entwickelt werden, um Nukleus-kodierte plastidäre Präproteine zurück in die Plastide – und damit über bis zu vier Membranen – ins Stroma zu transportieren (vgl. Abschnitt 1.2.2).

Basierend auf Datenbank-Analysen wurde 2007 von Sommer et al. postuliert, dass ein symbiontenspezifisches ERAD (ER-assoziierte Degradation)-ähnliches Transportsystem den Präproteintransport an der zweiten Plastidenmembran von Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen vermittelt (Sommer et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Hypothese in der Diatomee *P. tricornutum* experimentell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das ERAD-ähnliche System des Symbionten in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert ist und mit den Transitpeptiden periplastidärer Präproteine interagiert. Zudem legen die Ergebnisse nahe, dass bereits an der zweiten Plastidenmembran am sDer1-Komplex eine Unterscheidung periplastidärer und stromaler Präproteine stattfindet. Mit der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3 wurde möglicherweise ein weiterer essentieller Bestandteil der symbiontenspezifischen ERAD-Maschinerie identifiziert.

In nachfolgenden Abschnitten wird das symbiontenspezifische ERAD-System SELMA (*Symbiont-specific ERAD-like machinery*) genannt und die Ergebnisse vor dem Hintergrund funktioneller und evolutionärer Aspekte diskutiert.

3.1 SELMA: Ein vom ERAD-System abgeleiteter Präprotein-translokator

Das genuine ERAD (ER-assoziierte Degradation)-System liefert eine komplexe Maschinerie, um falsch gefaltete Proteine aus dem ER zurück ins Cytosol zu transportieren, wo anschließend die proteasomale Degradation stattfindet. Im Zentrum steht dabei ein durch die ATPase Cdc48 angetriebenes Ubiquitin-abhängiges Translokationssystem (vgl. Abschnitt 1.3.1).

Auf den Genomen verschiedener Chromalveolaten wurden zentrale Komponenten der ERAD-Translokationsmaschinerie zusätzlich zum wirtsspezifischen System in einer symbiontenspezifischen Version identifiziert (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Tatsache, dass die Proteine in Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen konserviert sind, obwohl in keinem der Organismen das ER des Symbionten erhalten wurde, legt eine essentielle, jedoch modifizierte Funktion dieser symbiontenspezifischen Faktoren nahe. Das ERAD-System ist das bislang einzig bekannte Translokationssystem für den Transport von Proteinen aus dem ER ins Cytoplasma („outside to inside transport“) und erfüllt damit ein Grundkriterium für einen Proteintranslokator der zweiten Plastidenmembran, der Proteine von einer exoplasmatischen Phase in das PPC, das ehemalige Cytosol des Endosymbionten, transportiert. Die Summe dieser Beobachtungen führte Sommer et al. 2007 daher zu der Hypothese, dass das symbiontenspezifische System im Laufe der Evolution zum Präproteintranslokator der zweiten Membran umfunktioniert wurde (Sommer et al, 2007).

3.1.1 Ein relokalisiertes Transportsystem

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe verschiedener *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die symbiontenspezifischen ERAD-Faktoren sDer1-1 und sDer1-2 von *P. tricornutum* in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert sind (vgl. Abschnitt 2.1.2). GFP-Lokalisationsstudien und elektronenmikroskopische Analysen ließen zunächst keine exakte Spezifizierung zu, da die mikroskopische Auflösung nicht ausreichte. Die genaue Lokalisation und Topologie der Proteine wurde unter Verwendung des Self-assembling GFP-Systems bestimmt und zeigte, dass beide Proteine eine zu Der1p aus Hefe und den

Derlin-Proteinen des Säugersystems vergleichbare Topologie aufweisen – mit dem C-Terminus auf der plasmatischen Seite (vgl. Abschnitt 2.1.2). Im Gegensatz zu Der1p und den Derlin-Proteinen sowie dem wirtsspezifischen Der1-2 Protein aus *P. tricornutum* (vgl. Abschnitt 2.1.2), sind die symbiontenspezifischen Der1-Proteine aber nicht in der ER-Membran, sondern in der periplastidären Membran, der zweiten Plastidenmembran, lokalisiert (vgl. Abschnitt 2.1.2). Die Proteine wurden im Laufe der Evolution vermutlich relokalisiert, wie in Abschnitt 3.2 ausführlicher diskutiert wird. Die Ergebnisse widerlegen damit die Hypothese, dass eines der beiden symbiontenspezifischen Der1-Proteine in der dritten Plastidenmembran lokalisiert sei (Gould et al, 2008; Lim et al, 2009).

Der1-Proteine sind zentrale Bestandteile des ERAD-L Systems und prominente Kandidaten für den Translokationskanal (Hirsch et al, 2009; Nakatsukasa & Brodsky, 2008). Interaktionsanalysen in Hefe und im Säugersystem haben zuvor gezeigt, dass die Proteine mit weiteren ERAD-Faktoren, wie beispielsweise Hrd1 und Cdc48, einen Komplex bilden (Carvalho et al, 2006; Gauss et al, 2006; Goder et al, 2008; Lilley & Ploegh, 2005; Oda et al, 2006; Ye et al, 2004). Eine Lokalisation der Membrankomponenten sDer1-1 und sDer1-2 in der zweiten Plastidenmembran legt demnach nahe, dass der gesamte SELMA-Komplex von *P. tricornutum* tatsächlich ein System der zweiten Plastidenmembran ist, und bestätigt damit eine Grundbedingung für die postulierte Funktion als Präproteintranslokator der periplastidären Membran (PPM).

3.1.2 Der sDer1-Komplex als Translokationskanal ?

Obwohl viele Details über die Mechanismen der ER-assoziierten Degradation bekannt sind und das genuine ERAD-System in Hefe und in Säugern relativ gut untersucht ist, konnte der Translokationskanal, der zumindest für die Retrotranslokation löslicher ERAD-Substrate postuliert werden muss, bislang nicht identifiziert werden. Der Sec61-Komplex und das Protein Der1p aus Hefe bzw. die Homologen Derlin-1, Derlin-2 und Derlin-3 aus dem Säugersystem werden als prominente Kandidaten diskutiert (Hirsch et al, 2009; Meusser et al, 2005; Nakatsukasa & Brodsky, 2008).

Im Folgenden werden Argumente für Sec61 bzw. die Der1-Proteine als Translokationskanal des genuinen ERAD-Systems zusammengefasst und anschließend auf

das symbiontenspezifischen ERAD-ähnliche System SELMA bezogen und in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

Bereits 1996 wurde postuliert, dass Sec61 als potentiell bidirektionaler Transporter Proteine nicht nur in das ER hinein transportiert, sondern auch am Proteintransport vom ER-Lumen zurück ins Cytosol beteiligt sein könnte (Wiertz et al, 1996). Verschiedene Untersuchungen in *S. cerevisiae* legen auch heute noch nahe, dass Sec61 mit ERAD-Substraten und auch anderen Komponenten des genuinen ERAD-Systems interagieren kann (Plempner et al, 1999; Schafer & Wolf, 2009; Willer et al, 2008). Da ER-Proteine allerdings über Sec61 bereits in das ER importiert werden, ist es schwierig ERAD-spezifische Interaktionen vom Importprozess zu unterscheiden. Zudem werden Studien mit Sec61-Mutanten dadurch erschwert, dass bereits der Proteintransport ins ER massiv beeinträchtigt wird und nachfolgende Prozesse, wie die ER-assoziierte Degradation, nur schwer zu untersuchen sind. Da eine direkte Beteiligung von Sec61 an der Translokation von ERAD-Substraten bislang nicht gezeigt werden konnte, bleibt die Rolle von Sec61 als ERAD-Translokator nach wie vor umstritten (Hirsch et al, 2009; Meusser et al, 2005; Nakatsukasa & Brodsky, 2008).

Um zu untersuchen, ob Sec61 im Rahmen von SELMA, dem ERAD-ähnlichen Präproteintransporter der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum*, eine Rolle spielt, wurde mittels Datenbank-Analysen nach symbiontenspezifischen Varianten des Sec61-Komplexes im Genom von *P. tricornutum* und anderen Chromalveolaten gesucht. Dabei konnten allerdings einzig die wirtsspezifischen Proteine und keine zusätzlichen Kandidaten für den Symbionten identifiziert werden (Sommer et al, 2007). Aus diesem Grund ist, unabhängig von den Diskussionen bezüglich des Translokators des genuinen ERAD-Systems, eine Rolle von Sec61 bei der SELMA-vermittelten Präproteintranslokation unwahrscheinlich.

Neben Sec61 werden auch die Der1-Proteine, Der1p aus Hefe und die Homologen Derlin1, Derlin2 und Derlin3 aus dem Säugersystem, immer wieder als Kandidaten für den Translokationskanal des genuinen ERAD-Systems diskutiert (Hirsch et al, 2009). Für Der1p aus Hefe wurde bereits 1996 gezeigt, dass durch eine Deletion von Der1p lösliche ERAD-Substrate im ER akkumulieren und nicht mehr degradiert werden können (Knop et al, 1996). Ebenso ist von den Derlin-Proteinen aus dem Säugersystem bekannt, dass sie für

die Degradation löslicher ERAD-Substrate von essentieller Bedeutung sind (Oda et al, 2006). Für Derlin-1 und Derlin-2 wurde mehrfach unabhängig gezeigt, dass die Proteine mit verschiedenen ERAD-Substraten interagieren (Bernardi et al, 2008; Lilley & Ploegh, 2004; Lilley & Ploegh, 2005; Ye et al, 2004). Zudem ist bekannt, dass die Der1-Proteine auch mit cytosolischen ERAD-Faktoren wie der ATPase Cdc48 einen Komplex bilden (Lilley & Ploegh, 2005; Oda et al, 2006). Aus der Summe dieser Beobachtungen wurde vielfach abgeleitet, dass die Proteine als Verbindungsglied zwischen ER und Cytosol fungieren und möglicherweise direkt an der Translokation beteiligt sind. Im Rahmen eines *in vitro* Retrotranslokationssystems wurde kürzlich zudem gezeigt, dass die Translokation eines löslichen ERAD-Substrates durch die Zugabe von Derlin-1 spezifischen Antikörpern inhibiert werden kann (Wahlman et al, 2007).

In *P. tricornutum* existieren zwei symbiontenspezifische Versionen des Der1-Proteins, die, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, beide in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert sind (vgl. Abschnitt 2.1.2). Da Der1-Proteine nur ein Molekulargewicht von ca. 26 kDa besitzen und lediglich vier Transmembrandomänen aufweisen, ist die Bildung von Oligomeren eine Grundvoraussetzung für die postulierte Funktion als Translokationskanal. Um zu untersuchen, ob sDer1-1 und sDer1-2 aus *P. tricornutum* diese Bedingung erfüllen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer Kombination von *in vitro* und *in vivo* Studien getestet, ob die Proteine in einem Komplex organisiert sind. Mittels Co-Immunopräzipitation konnte dabei gezeigt werden, dass sDer1-1 und sDer1-2 miteinander interagieren und sDer1-2 zusammen mit einem sDer1-2 GFP-Fusionsprotein auch Homo-Oligomere ausbilden kann (vgl. Abschnitt 2.1.3.). Unter Verwendung des Split-GFP-System konnten diese Beobachtungen *in vivo* in *P. tricornutum* bestätigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass auch das Protein sDer1-1 als Homo-Dimer *in vivo* existiert (vgl. Abschnitt 2.1.3). Die Proteine sDer1-1 und sDer1-2 sind folglich in der Lage Oligomere zu bilden und zeigen damit ein zu den Derlin-Proteinen aus dem Säugersystem (Derlin-1 und Derlin-2) und Der1p aus Hefe vergleichbares Profil (Crawshaw et al, 2007; Goder et al, 2008; Lilley & Ploegh, 2005; Oda et al, 2006).

Die symbiontenspezifischen Der1-Proteine sind in einem oligomeren Komplex in der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum* organisiert und erfüllen somit eine Grundvoraussetzung für einen Transportkanal des SELMA-Systems. *In vivo*

Interaktionsstudien haben zudem gezeigt, dass der sDer1-Komplex mit potentiellen Transportsubstraten, den Transitpeptiden periplastidärer Proteine, interagiert (vgl. Abschnitt 2.1.4) und legen somit eine essentielle Rolle des sDer1-Komplexes bei der Substrattranslokation nahe.

3.1.3 Aromatisch oder nicht aromatisch - Unterscheidung am sDer1-Komplex

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Transitpeptide periplastidärer Proteine mit dem sDer1-Komplex interagieren (vgl. Abschnitt 2.1.4). Damit wurde ein erster experimenteller Hinweis dafür geliefert, dass in der Tat ein Zusammenhang zwischen dem symbiontenspezifischen ERAD-System und dem Präproteintransport an der zweiten Plastidenmembran besteht. Für die Interaktionsanalysen wurde das *in vivo* Split-GFP-System (Kerppola, 2006) genutzt, das im Vergleich zu andern Interaktionssystemen den Vorteil bietet, dass auch transiente Proteininteraktionen untersucht werden können. GFP wird dabei in zwei Fragmente gespalten, die an potentielle Interaktionspartner fusioniert werden und nur dann assemblieren, wenn die Proteine von Interesse interagieren. Sobald sich der GFP-Komplex ausgebildet hat, visualisiert durch die GFP-Fluoreszenz, ist der Komplex stabil, unabhängig davon, ob die Interaktion der Proteine von Interesse weiter besteht (Kerppola, 2006). Dies ist bei der Analyse der Interaktion von sDer1-Proteinen und Transitpeptiden ein großer Vorteil, da das Transitpeptid anschließend im PPC abgespalten wird (Deschamps et al, 2006; Gould et al, 2006b).

Im Gegensatz zu den Transitpeptiden periplastidärer Proteine wurde für stromale Transitpeptide keine Interaktion mit dem sDer1-Komplex beobachtet (vgl. Abschnitt 2.1.4). Da auf Grund des experimentellen Aufbaus per se nur Interaktionen auf der periplasmatischen Seite detektiert werden konnten, wurde unter Verwendung verkürzter sDer1-Proteine (die das GFP-Fragment auf der exoplasmatischen Seite tragen) getestet, ob eine Interaktion mit stromalen Transitpeptiden möglicherweise bereits im ER-Lumen erfolgt. Unter Verwendung der verkürzten sDer1-Proteine zeigten jedoch weder stromale noch periplastidäre Transitpeptide eine Interaktion (vgl. Abschnitt 2.1.4). Folglich muss davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus von sDer1-Proteinen essentiell für die Interaktion ist oder aber die Interaktion alleine auf der

periplasmatischen Seite stattfindet, und zwar lediglich mit Transitpeptiden periplastidärer, nicht aber stromaler Proteine.

Vorangehende Studien in *P. tricornutum* haben gezeigt, dass die +1 Position des Transitpeptids eine kritische Rolle bei der Unterscheidung periplastidärer und stromaler Proteine spielt (Gould et al, 2006a; Kilian & Kroth, 2005). So besitzen stromale Proteine an dieser Position immer eine aromatische Aminosäure (oder in seltenen Fällen ein Leucin), in der Regel ein Phenylalanin (F). Periplastidäre Proteine tragen an der +1 Position des Transitpeptids hingegen eine nicht-aromatische Aminosäure (Gruber et al, 2007). Da auch Nukleomorph-kodierte Plastidenproteine der Cryptophyten (Cavalier-Smith, 2003) sowie Proteine primärer Plastiden der Glaucophyten und Rodophyten dieses konservierte Phenylalanin in der N-terminalen Region des Transitpeptids tragen (Patron & Waller, 2007; Steiner & Löffelhardt, 2002), ist anzunehmen, dass die aromatische Aminosäure beim Transport an der dritten Membran der komplexen Plastide von Bedeutung ist. In *P. tricornutum* konnte 2006 zudem gezeigt werden, dass alleine durch die Mutation dieser +1 Position des Transitpeptids von einer nicht-aromatischen in eine aromatische Aminosäure ein periplastidäres Protein über alle vier Membranen ins Stroma der Plastide dirigiert werden kann (Gould et al, 2006a).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die erste Aminosäure des Transitpeptids jedoch nicht allein an der dritten Plastidenmembran, sondern zudem bereits an der zweiten Plastidenmembran bei der Interaktion mit dem sDer1-Komplex eine kritische Rolle spielt (vgl. Abschnitt 2.1.5). So konnte durch die Mutation der besagten Position von einer aromatischen in eine nicht-aromatische Aminosäure eine Interaktion zwischen dem stromalen Transitpeptid von AtpC und beiden sDer1-Proteinen induziert werden. Umgekehrt wurde durch die Mutation der +1 Position des periplastidären Transitpeptids von sHsp70 (von einer nicht-aromatischen zu einer aromatischen Aminosäure) die Interaktion mit den sDer1-Proteinen inhibiert (vgl. Abschnitt 2.1.5).

Aus der Summe der Beobachtungen lässt sich folgendes Modell für die Interaktion von Transitpeptiden am Der1-Komplex ableiten: Die Transitpeptide periplastidärer Proteine interagieren mit dem sDer1-Komplex auf der periplasmatischen Seite und werden dort zurückgehalten und prozessiert und damit in einem ersten Schritt von stromalen

Proteinen unterschieden. Stromale Proteine interagieren nicht mit dem sDer1-Komplex und werden von sHsp70 und weiteren Faktoren gebunden und direkt an die dritte Plastidenmembran transportiert (Abb. 3-1).

Die erste Aminosäure des Transitpeptids spielt bei der Interaktion am sDer1-Komplex offensichtlich eine essentielle Rolle; über den Mechanismus dieser Unterscheidung kann jedoch nur spekuliert werden. Möglicherweise verhindert die aromatische Aminosäure die Bindung an die sDer1-Proteine auf direktem Wege, etwa durch eine sterische Blockade. Alternativ könnte die Interaktion mit dem sDer1-Komplex natürlich auch indirekt blockiert werden, beispielsweise dadurch, dass stromale Transitpeptide im PPC direkt von anderen Proteinen gebunden werden und somit keine Interaktion mit sDer1-Proteinen stattfinden kann. Dabei könnte es sich z.B. um einen löslichen Rezeptor (Faktor X) handeln, der für eine Erkennung an der dritten Membran essentiell ist (Abb. 3-1). Unabhängig vom SELMA-System wurde ein solcher Rezeptor für stromale Proteine schon zuvor postuliert (Gould, 2006).

Schlussendlich könnten die Ergebnisse dieser Interaktionsanalysen auch anders interpretiert werden. So kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass stromale und periplastidäre Proteine verschiedene Transportwege an der zweiten Plastidenmembran nutzen, einen SELMA-abhängigen Mechanismus im Falle von periplastidären Proteinen und eine SELMA-unabhängige Route im Falle der stromalen Proteine. Ein konditionaler Knockout eines symbiontenspezifischen Der1-Proteins in *Toxoplasma gondii* zeigt jedoch, dass der Transport Nukleus-kodierter Proteine in das Stroma des Apikoplasten reduziert wird (Agrawal et al, 2009), und legt nahe, dass der Transport beider Proteinpopulationen auch in *P. tricornutum* über SELMA vermittelt wird. Da Knockout-Analysen in *P. tricornutum* bislang nicht möglich sind, lässt sich diese Fragestellung im Moment jedoch nicht im homologen System prüfen.

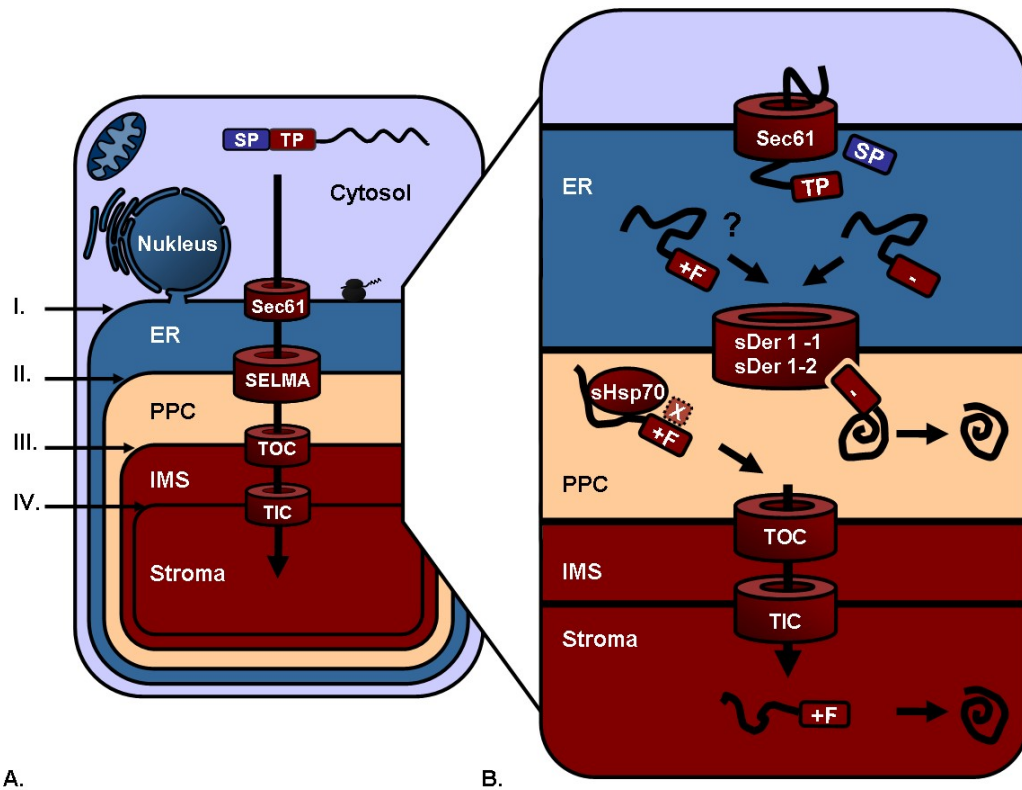


Abb. 3-1: Modell zur Unterscheidung periplastidärer und stromaler Präproteine am sDer1-Komplex der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum*. A. Die komplexe Plastide der Diatomee *P. tricornutum* ist von vier Membranen (I. - IV.) umgeben, wobei die äußerste Membran (I.) mit dem ER der Wirtszelle in Verbindung steht. Der Transport an der zweiten Plastidenmembran (II.) erfolgt vermutlich über das SELMA-System. B. Beim Präproteintransport an der zweiten Plastidenmembran wird bereits am sDer1-Komplex von SELMA zwischen periplastidären und stromalen Präproteinen unterschieden. Während die Transitpeptide periplastidärer Proteine (-) mit sDer1-1 und sDer1-2 interagieren und periplastidäre Proteine dadurch möglicherweise vom weiteren Transport zurückgehalten werden, ist für stromale Transitpeptide (+F) keine Interaktion mit dem sDer1-Komplex zu beobachten. Stromale Proteine werden vermutlich direkt von weiteren Faktoren gebunden und an die dritte Membran transportiert. Für die Interaktion mit dem sDer1-Komplex spielt die +1 Position des Transitpeptids eine kritische Rolle. So verhindert die Mutation von einer nicht-aromatischen zu einer aromatischen Aminosäure im Transitpeptid eines periplastidären Proteins die Interaktion mit den sDer1-Proteinen. Umgekehrt kann die Interaktion eines stromalen Transitpeptids mit dem sDer1-Komplex induziert werden, wenn die +1 Position durch eine nicht-aromatische Aminosäure ersetzt wird. Details zum Modell sind dem Text zu entnehmen. F - Phenylalanin, IMS - Intermembrane space, PPC – periplastidäres Kompartiment, SELMA – symbiont-specific ERAD-like machinery, SP – Signalpeptid, TOC/TIC – Translocon of the outer/inner chloroplast membrane, TP – Transitpeptid (Abbildung aus Hempel et al. 2009, modifiziert).

3.1.4 s-E3 und SELMA

RING-Finger Ubiquitin-Ligasen sind essentielle Komponenten des genuinen ERAD-Systems und vermitteln noch während der Substrattranslokation vom ER ins Cytosol den Transfer von Ubiquitinmolekülen auf das Substrat (Carvalho et al, 2006; Kostova et al, 2007). Die Ubiquitinierung dient dabei zum einen als Markierung für den proteasomalen Abbau, zum anderen ist eine Ubiquitinierung bereits für den Translokationsprozess essentiell (de Virgilio et al, 1998; Shamu et al, 2001). So erkennt die ATPase Cdc48 zusammen mit Kofaktoren das auf diese Weise markierte Substrat und liefert im Folgenden die Energie für die Retrotranslokation (Jarosch et al, 2002; Meyer et al, 2002; Ye et al, 2003). Im Rahmen des ERAD-L und ERAD-M Systems wird der finale Ubiquitinierungsschritt durch die Ubiquitin-Ligase Hrd1 (E3-Enzym) vermittelt (Bays et al, 2001; Bordallo et al, 1998; Deak & Wolf, 2001). Unter der Annahme, dass der Grundmechanismus der Substrattranslokation auch bei SELMA, dem symbiontenspezifischen ERAD-ähnlichen System der zweiten Plastidenmembran, konserviert ist, muss postuliert werden, dass eine Ubiquitin-Ligase auch hier einen zentralen Bestandteil des Translokationskomplexes bildet. Da Hrd1-Proteine allerdings nur schwach konserviert sind, gelang es mittels Datenbank-Analysen bislang nicht, symbiontenspezifische Versionen des Proteins in anderen Chromalveolaten als den Cryptophyten zu identifizieren, die auf dem Nukleomorphgenom eine symbiontenspezifische Variante von Hrd1 kodieren (Sommer et al, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch breiter gefasste Datenbankanalysen das Protein s-E3 als symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase in der Diatomee *P. tricornutum* identifiziert werden (vgl. Abschnitt 2.2.1). s-E3 besitzt ein mit Hrd1p aus *S. cerevisiae* vergleichbares Molekulargewicht und trägt im C-terminalen Bereich eine konservierte RING-H2-Domäne, wie sie für RING-Finger-Ligasen charakteristisch ist. Im Gegensatz zu Hrd1-Proteinen besitzt s-E3 aus *P. tricornutum* laut *in silico* Vorhersagen allerdings nur eine anstelle von sechs Transmembrandomänen (vgl. Abschnitt 2.2.2). Nachfolgende Untersuchungen haben gezeigt, dass s-E3 *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität besitzt und es sich folglich um eine funktionelle Ubiquitin-Ligase, ein E3-Enzym, handelt (vgl. Abschnitt 2.2.4). Untersuchungen zur Lokalisation und Topologie haben zudem bestätigt, dass s-E3 ein symbiontenspezifisches Membranprotein ist und die katalytische RING-Domäne ins

periplastidäre Kompartiment weist (vgl. Abschnitt 2.2.3). Diese Orientierung ist für eine potentielle Funktion am SELMA-Komplex essentiell, da gemäß dem Modell Präproteine auf der cytoplasmatischen Seite, also im PPC, ubiquitiniert werden müssen. Untersuchungen mit dem Self-assembling GFP-System legen für s-E3 eine Lokalisation in der zweiten Plastidenmembran nahe, wenn auch im Rahmen des experimentellen Ansatzes eine Lokalisation in der dritten Plastidenmembran nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann (vgl. Abschnitt 2.2.3). Da s-E3 jedoch an +1 Position des Transitpeptids eine nicht-aromatische Aminosäure trägt, ist eine Lokalisation in der dritten Plastidenmembran unwahrscheinlich. Eine aromatische Aminosäure an +1 Position des Transitpeptids ist für den Transport über Membranen drei und vier essentiell und wurde auch bei einem integralen Membranprotein der dritten Plastidenmembran, einem Toc75-Homolog, identifiziert (Bullmann et al, 2009).

Im Rahmen der Fragestellung, ob s-E3 möglicherweise eine Rolle bei der SELMA-vermittelten Präproteintranslokation spielt, werden im Folgenden das Protein s-E3 aus *P. tricornutum* und Hrd1p aus *S. cerevisiae* strukturell verglichen und Grundkriterien für eine Ubiquitin-Ligase des SELMA-Systems diskutiert.

Die ERAD-spezifische Ubiquitin-Ligase Hrd1 besitzt sechs Transmembrandomänen in der N-terminalen Region und eine RING-H2-Domäne im C-terminalen cytoplasmatischen Bereich (vgl. Abschnitt 2.2.2). Während die RING-H2-Domäne am C-Terminus essentiell für die katalytische Funktion der Ubiquitin-Ligase ist, spielen die N-terminalen Transmembranregionen für die enzymatische Funktion von Hrd1 keine Rolle. So reicht im Fall von Hrd1p aus *S. cerevisiae* der C-terminale Bereich bereits für eine *in vitro* Ubiquitinierung von Test-Substraten aus (Bays et al, 2001). Die N-terminalen Transmembranregionen sind hingegen an Prozessen der Substrat-Erkennung im ER-Lumen beteiligt (Sato et al, 2009) und vermitteln die Interaktion mit dem TPR-Protein Hrd3p, das bei der Substraterkennung im ER eine entscheidende Rolle spielt (Gardner et al, 2000; Gauss et al, 2006). Auch eine Funktion als kanalbildende Komponente wurde für die N-terminalen Transmembranregionen von Hrd1 bereits diskutiert. Aktuelle Untersuchungen von Garza et al. lassen allerdings vermuten, dass die Transmembrandomänen von Hrd1 für den eigentlichen Translokationsprozess nicht

essentiell sind. So zeigten *in vitro* Analysen zur Substrattranslokation, dass allein die Ubiquitinierungsaktivität für die Retrotranslokation ausreicht (Garza et al, 2009).

Im Unterschied zu Hrd1p aus *S. cerevisiae*, aber auch zu dem endogenen wirtsspezifischen Hrd1-Protein von *P. tricornutum*, besitzt die symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 lediglich eine Transmembrandomäne. In Anbetracht der Tatsache, dass das genuine ERAD-System und SELMA parallel in der ER-Membran bzw. der zweiten Plastidenmembran existieren, müssen jedoch gerade bei der Substraterkennung im ER-Lumen signifikante Unterschiede postuliert werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass für das symbiontenspezifische ERAD-System in keinem der untersuchten Chromalveolaten-Genome das TPR-Protein Hrd3 identifiziert werden konnte (Sommer, 2007). Da die N-terminalen Transmembrandomänen von Hrd1 bislang fast ausschließlich mit Prozessen der Substraterkennung assoziiert wurden, ist die N-terminale Region in dieser Form für das SELMA-System möglicherweise nicht essentiell. Grundkriterien für eine Ubiquitin-Ligase des SELMA-Systems sind daher möglicherweise lediglich eine Membranverankerung sowie Ubiquitinierungsaktivität auf der periplasmatischen Seite. Da im Rahmen von *in silico* Analysen keine weiteren symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligasen identifiziert wurden, und s-E3 die genannten Kriterien erfüllt, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich um das gesuchte Protein handelt.

Im Gegensatz zu Heterokontophyten, Haptophyten und Apikomplexen besitzen Cryptophyten eine symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase, die ebenso wie Hrd1p aus Hefe und das wirtsspezifische Hrd1-Protein aus *P. tricornutum* sechs Transmembrandomänen aufweist (vgl. Abschnitt 2.2.5). Die Tatsache, dass das Protein jedoch auf dem Nukleomorphgenom kodiert ist und das Gen folglich nicht in den Nukleus der Wirtszelle transferiert wurde, könnte eine Erklärung dafür sein, dass das Protein weniger Modifikationen aufweist und die ursprüngliche Grundstruktur erhalten ist. So impliziert ein Gentransfer in den Nukleus der Wirtszelle einen Rücktransport des Proteins über mehrere Membranen und wird durch eine hohe Anzahl von Transmembrandomänen vermutlich erschwert. In Chromalveolaten, die keinen Nukleomorph besitzen, wie Haptophyten, Apikomplexen und Heterokontophyten, kann kein symbiontenspezifisches Hrd1-Homolog mit sechs Transmembrandomänen

identifiziert werden. Vergleichbar mit *P. tricornutum* kommen auch in diesen Organismen allein Kandidaten mit strukturellen Modifikationen in Betracht (vgl. Abschnitt 2.2.5). Möglicherweise wurde das ursprüngliche Hrd1-Protein modifiziert oder durch ein anderes Protein ersetzt, das die SELMA-spezifischen Funktionen erfüllt.

Letztendlich spielen Ubiquitin-Ligasen auch bei regulatorischen Prozessen wie beispielsweise Signaltransduktion und Endocytose eine entscheidende Rolle (Mukhopadhyay & Riezman, 2007). Da das periplastidäre Kompartiment von Diatomeen jedoch stark reduziert ist und vermutlich keine oder nur ein Minimum an Stoffwechselwegen erhalten wurden, ist es – wenn auch nicht ausgeschlossen – doch relativ unwahrscheinlich, dass die soweit einzige identifizierte Ubiquitin-Ligase dieses Kompartiments eine andere als die postulierte Funktion erfüllt. Ein Zusammenhang zwischen s-E3 und SELMA muss aber experimentell in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

3.1.5 Modell zur SELMA-vermittelten Präproteintranslokation

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass das symbiontenspezifische ERAD-ähnliche System von *P. tricornutum* (SELMA) in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert ist und mit den Transitpeptiden von periplastidären Präproteinen interagiert. Offensichtlich wurde das ERAD-System des Symbionten im Laufe der Evolution modifiziert und zum Präproteintranslokator umfunktioniert (Hempel et al, 2009). Basierend auf Untersuchungen zur Substrattranslokation beim genuinen ERAD-L System in *S. cerevisiae* wird im Folgenden ein Modell für die SELMA-vermittelte Präproteintranslokation an der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum* beschrieben.

Die komplexe Plastide von *P. tricornutum* ist von vier Membranen umgeben, wobei die äußere Membran, die erste Plastidenmembran, mit dem ER der Wirtszelle in Verbindung steht (vgl. Abschnitt 1.2.2). Nukleus-kodierte plastidäre Proteine werden zunächst kotranslational über den Sec61-Komplex ins ER transportiert und prozessiert und müssen anschließend an die zweite Plastidenmembran, an den SELMA-Komplex, rekrutiert werden. Da das SELMA-System zusätzlich zum genuinen ERAD-System des Wirtes existiert, muss postuliert werden, dass die Substraterkennung im ER-Lumen anders als

beim genuine ERAD-System abläuft, so dass eine Unterscheidung beider Systeme gewährleistet ist. Während bestimmte Glykosylierungsmuster sowie die Bindungsdauer an verschiedene Chaperone für die Erkennung falsch gefalteter Proteine durch das genuine ERAD-System von Bedeutung sind (vgl. Abschnitt 1.3.1.1), spielt für die Substraterkennung am SELMA-Komplex vermutlich in erster Linie das Transitpeptid der zweigeteilten Zielsteuerungssequenz eine zentrale Rolle. So haben vorangehende Untersuchungen in *P. tricornutum* und der Cryptophyte *G. theta* gezeigt, dass das Transitpeptid nicht nur für den Transport ins Stroma, sondern bereits für den Transport ins periplastidäre Kompartiment notwendig ist und anschließend abgespalten wird (Deschamps et al, 2006; Gould et al, 2007; Gould et al, 2006a; Gould et al, 2006b). Im ER-Lumen werden plastidäre Proteine vermutlich von Chaperonen gebunden und das Transitpeptid von einem bislang nicht identifizierten löslichen oder membranständigen Rezeptor erkannt und an den SELMA-Komplex in der zweiten Plastidenmembran rekrutiert (Abb. 3-2).

Wie beim genuine ERAD-System ist auch bei SELMA nicht bekannt, welche Proteine den Translokationskanal bilden. Ein Sec61-abhängiger Transport, wie er für das genuine ERAD-System zum Teil diskutiert wird, ist jedoch unwahrscheinlich, da in *P. tricornutum* und anderen Chromalveolaten keine symbiontenspezifischen Versionen von Sec61 identifiziert werden konnten (Sommer et al, 2007). Möglicherweise sind die symbiontenspezifischen Der1-Proteine Teil dieses Kanals. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sDer1-1 und sDer1-2 einen oligomeren Komplex in der zweiten Plastidenmembran von *P. tricornutum* bilden und mit den Transitpeptiden periplastidärer Proteine interagieren.

Untersuchungen in Hefe und im Säugersystem haben gezeigt, dass ERAD-Substrate auf der cytosolischen Seite von E1-, E2- und E3-Enzymen mono- bzw. oligoubiquitiniert werden (Bays et al, 2001; Deak & Wolf, 2001; Friedlander et al, 2000; Kikkert et al, 2004). Anschließend werden die auf diese Weise markierten Substrate von der ATPase Cdc48 und den Kofaktoren Ufd1 und Npl4 gebunden und unter ATP-Verbrauch aus der Membran extrahiert (Bays & Hampton, 2002; Jarosch et al, 2002; Ye et al, 2003). Erst durch diesen Extraktionsprozess kann der Translokationsmechanismus abgeschlossen werden. Auf Grund der Tatsache, dass auch beim SELMA-System der Chromalveolaten die meisten dieser Komponenten konserviert sind (Sommer et al, 2007), ist zu postulieren,

dass der Mechanismus der Substratextraktion vergleichbar abläuft. So werden in *P. tricornutum* plastidäre Präproteine möglicherweise durch sUba1 (E1-Enzym), sUbc4 bzw. sUbc6 (E2-Enzym) und die in dieser Arbeit identifizierte symbiontenspezifische Ubiquitin-Ligase s-E3 (E3-Enzym) auf der periplastidären Seite ubiquitiniert und anschließend von sCdc48 und sUfd1 gebunden (Abb. 3-2). Für die finale Substratextraktion müssen für das SELMA-System allerdings einige Modifikationen angenommen werden, da der Cdc48-Kofaktor Npl4 weder in *P. tricornutum* noch in anderen Chromalveolaten in einer symbiontenspezifischen Version identifiziert werden konnte. Zudem handelt es sich bei den symbiontenspezifischen Ufd1-Proteinen um C-terminal verkürzte Varianten, denen die Bindestelle für Npl4, aber auch für Cdc48 fehlt (Sommer et al, 2007). Aus diesem Grund muss für SELMA vermutlich ein anderer Kofaktor als Npl4 postuliert werden, der die Assoziation von sUfd1 und sCdc48 vermittelt und die Bindung des ATPase-Komplexes an ubiquitinierte Substrate verstärkt. Da Cdc48 – abhängig vom funktionellen Kontext – mit verschiedenen Kofaktoren interagiert (Meyer et al, 2000), ist die Annahme eines solchen SELMA-spezifischen Kofaktors jedoch durchaus plausibel.

Im Anschluss an die Substrattranslokation werden im genuinen ERAD-System die Substrate, die zunächst lediglich 2-3 Ubiquitinmoleküle tragen, von Ufd2 (E4-Enzym) gebunden (Koegl et al, 1999; Richly et al, 2005). Das E4-Enzym verlängert die Ubiquitinkette, so dass die Faktoren Rad23 und Dsk2 das Substrat erkennen und zum Proteasom transportieren können, wo der eigentliche Degradationsprozess abläuft (Medicherla et al, 2004). Weder Ufd2 noch die Komponenten Rad23 und Dsk2 wurden in *P. tricornutum* oder anderen Chromalveolaten in einer symbiontenspezifischen Version identifiziert (Sommer et al, 2007). Im Falle der Cryptophyten, die noch ein Proteasom im PPC erhalten haben (Douglas et al, 2001), ist diese Beobachtung durchaus von Bedeutung und bestätigt nochmals die degradations-unabhängige Rolle der SELMA-Komponenten. Der Substrattranslokation nachfolgende Prozesse sind mit dem genuinen ERAD-System nicht vergleichbar. Mit Abschluss der SELMA-vermittelten Präproteintranslokation werden Ubiquitinmoleküle vermutlich vom Präprotein entfernt. Erst kürzlich wurde in *P. tricornutum* ein symbiontenspezifisches deubiquitinierendes Enzym identifiziert, das diese Funktion möglicherweise erfüllt (unveröffentlichte Daten) (Abb. 3-2). Während der

Transport periplastidärer Proteine damit abgeschlossen ist, werden stromale Präproteine vermutlich direkt von weiteren Faktoren gebunden und an die dritte Plastidenmembran rekrutiert.

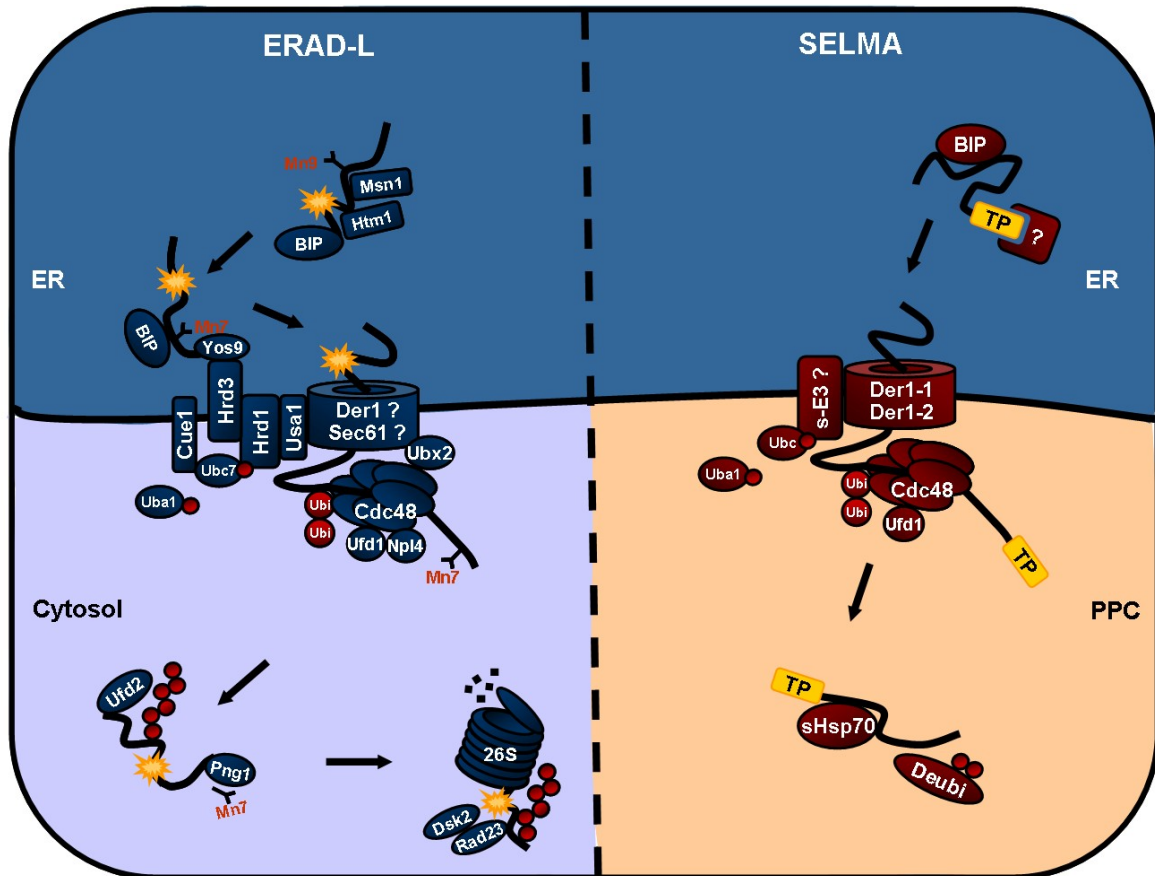


Abb. 3-2: Modell zur SELMA-vermittelten Präproteintranslokation in *P. tricornutum* im Vergleich zum genuine ERAD-L System aus *S. cerevisiae*. Links: Im Rahmen des ERAD-L Systems werden falsch gefaltete Proteine (Läsionen durch Sterne markiert) anhand spezifischer Glykosylierungsmuster im ER erkannt und an den ERAD-Komplex und den Translokationskanal herangeführt. Anschließend werden die Proteine durch Uba1, Ubc-Proteine und die Ubiquitin-Ligase Hrd1 ubiquitiniert und durch die ATPase Cdc48 und den Kofaktoren Ufd1 und Npl4 aus der Membran extrahiert. Rechts: Im Rahmen der SELMA-vermittelten Präproteintranslokation wird das Transitpeptid plastidärer Präproteine im ER durch einen unbekannten Rezeptor (?) erkannt und das Protein an den SELMA-Komplex rekrutiert. Der Translokationskanal wird möglicherweise durch die Proteine sDer1-1 und sDer1-2 gebildet. Auf der periplasmatischen Seite werden die Präproteine durch Uba1, Ubc4/6 und die Ubiquitin-Ligase s-E3 ubiquitiniert und durch die ATPase Cdc48 und den Kofaktor Ufd1 aus der Membran extrahiert. Anschließend wird das Protein von Chaperonen gebunden und Ubiquitinmoleküle werden durch ein deubiquitinierendes Enzym (DeUbi) entfernt. ERAD-L – ER-assoziierte Degradation von Proteinen mit lumenalen Läsionen, PPC – periplastidäres Kompartiment, SELMA – *symbiont-specific ERAD-like machinery*, TP – Transitpeptid.

Im Ganzen spricht die Konservierung zentraler Komponenten der symbiontenspezifischen ERAD-Transportmaschinerie dafür, dass die Präproteintranslokation am SELMA-System mechanistisch dem Translokationsprozess des genuinen ERAD-Systems entspricht. Der Translokation vor- bzw. nachgeschaltete Prozesse sind nicht mit dem genuinen ERAD-System vergleichbar. Um zu prüfen, inwieweit das hier beschriebene Modell zur Substrattranslokation zutrifft, sind weitere Untersuchungen notwendig. Erste Hinweise legen jedoch nahe, dass Präproteine ubiquitiniert werden (unveröffentlichte Daten) und damit eine Grundannahme dieses Modells bestätigt wird.

3.2 Evolution des SELMA-Systems

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das SELMA-System von *P. tricornutum* in der zweiten Plastidenmembran lokalisiert und am Transport plastidärer Präproteine beteiligt ist.

Phylogentische Analysen verschiedener SELMA-Komponenten (sCdc48 und sUba1) bestätigen die Annahme, dass diese Faktoren auf den Symbionten, die Rotalge, zurückgehen (Felsner et al, 2009). Zentrale Komponenten des ERAD-Systems des Symbionten, wie die Membranproteine sDer1-1 und sDer1-2, wurden somit im Zuge der Endosymbiose von der ER-Membran des Symbionten in die zweite Plastidenmembran relokalisiert und zum Präproteintranslokator SELMA umfunktioniert. Initial müssen drei grundlegende Entwicklungen für die Evolution des SELMA-Systems postuliert werden i) die Relokalisierung des symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates, ii) die Entwicklung eines Mechanismus zur SELMA-spezifischen Substraterkennung, iii) die Verhinderung der proteasomalen Degradation von SELMA-Substraten im PPC.

Über die Mechanismen der Relokalisierung des symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates lässt sich nur spekulieren und das wird dadurch erschwert, dass der Ursprung der zweiten Plastidenmembran im Grunde nicht klar ist. Auf theoretischer Basis postulierte Cavalier-Smith, dass es sich um die ursprüngliche Plasmamembran des Endosymbionten handelt (Cavalier-Smith, 1999); abgeleitet von der Zellarchitektur der Cryptophyten ist dies eine plausible und breit akzeptierte Annahme. Andere Spekulationen gehen in die Richtung, dass es sich bei der zweiten Plastidenmembran

ursprünglich um eine weitere ER-Membran des Wirtes handelt. Diesem Szenario zufolge hätte sich im Zuge eines autophagosomalen Prozesses eine ER-Zisterne um den Symbionten gelegt und die Cytoplasmamembran des Symbionten wäre entweder eliminiert worden oder mit der zweiten ER-Membran verschmolzen (Melkonian, 1996).

Für die initiale Relokalisierung des symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates sind im Fall beider Modelle verschiedene Mechanismen denkbar. Sollte es sich bei der periplastidären Membran um die ehemalige Cytoplasmamembran des Symbionten handeln, könnten die symbiontenspezifischen ERAD-Faktoren des membranständigen Translokationsapparates ursprünglich bereits durch geringe Modifikationen auf dem sekretorischen Weg in die periplastidäre Membran gelangt sein. Sollte es sich hingegen ursprünglich um eine ER-Membran des Wirtes handeln, wurden die symbiontenspezifischen Proteine möglicherweise nicht nur in die ER-Membran des Symbionten integriert, sondern hatten nach Eliminierung oder Fusion der symbiontischen Plasmamembran auch direkten Zugang zur zweiten Plastidenmembran. Auch durch eine Fusion des Endomembransystems des Symbionten mit der zweiten Plastidenmembran wäre eine initiale Relokalisierung der Komponenten des symbiontenspezifischen ERAD-Translokationsapparates denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Topologie zentraler Faktoren des Translokationsapparates, wie den Proteinen sDer1-1 und sDer1-2, durch diese Relokalisierung nicht gestört wurde (vgl. Abschnitt 2.1.2); die Orientierung des Transportsystems (exoplasmatisch → plasmatisch) konnte dadurch beibehalten werden.

Da das SELMA-System der zweiten Plastidenmembran parallel zum genuine ERAD-System des Wirtes existiert, sind für die Erkennung im ER-Lumen für beide Systeme unterschiedliche Mechanismen zu postulieren. Das dies der Fall ist, zeigt sich unter anderem dadurch, dass das TPR-Protein Hrd3, welches im genuine ERAD-System eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung spielt (vgl. Abschnitt 1.3.1.1), nicht in einer symbiontenspezifischen Variante erhalten wurde (Sommer et al, 2007). Für die Etablierung von SELMA als Präproteintransportsystem war somit die Entwicklung eines neuen Rezeptors essentiell, der Präproteine im ER-Lumen erkennt und an den SELMA-Komplex rekrutiert. Für diesen Erkennungsprozess spielt das Transitpeptid der zweigeteilten Zielsteuerungssequenz eine wichtige Rolle. Auch wenn ein Transitpeptid-

Rezeptor bislang nicht identifiziert werden konnte, muss ein entsprechender löslicher oder membrangebundener Faktor postuliert werden, der diese Funktion erfüllt.

Nukleus-kodierte plastidäre Präproteine aus primärer Endosymbiose besaßen bereits ein N-terminales Transitpeptid für die TOC/TIC-vermittelte Translokation an den Hüllmembranen der primären Plastide. Im Rahmen der sekundären Endosymbiose wurde diese Zielsteuerungssequenz auch für das SELMA-System als Erkennungssignal etabliert und wird auf diese Weise vermutlich sowohl vom SELMA-System an der zweiten als auch der TOC/TIC-Maschinerie an der dritten und vierten Plastidenmembran erkannt. Nukleus-kodierte stromale Proteine mussten im Rahmen der sekundären Endosymbiose und im Zuge des Gentransfers in den Nukleus des sekundären Wirtes somit wahrscheinlich lediglich ein N-terminales Signalpeptid erwerben, um auch die erste Plastidenmembran überqueren zu können. Im Gegensatz dazu besaßen Nukleus-kodierte Proteine, die in das periplastidäre Kompartiment transportiert werden, vor dem Gentransfer in den Nukleus des sekundären Wirtes kein Transitpeptid. Die Gene mussten im Rahmen der sekundären Endosymbiose folglich mit Sequenzen für Signal- und Transitpeptid versehen werden.

Schließlich war es im Rahmen der Evolution von SELMA essentiell, den Translokationsprozess an der zweiten Membran von der proteasomalen Degradation im periplastidären Kompartiment zu trennen. So hat zu Beginn der Evolution das genuine ERAD-System des Endosymbionten möglicherweise parallel zum relokaisierten Translokationssystem der zweiten Plastidenmembran existiert. Cryptophyten, bei denen im periplastidären Kompartiment u. a. noch Proteinbiosynthese stattfindet, haben das Proteasom des periplastidären Kompartiments auch heute noch erhalten (Douglas et al, 2001). Um die proteasomale Degradation von SELMA-Substraten im periplastidären Kompartiment zu verhindern, war die Eliminierung von Faktoren wie Ufd2 und Rad23, die im Anschluss an den Translokationsprozess falsch gefaltete Proteine polyubiquitinieren und den Transport zum Proteasom vermitteln, vermutlich essentiell. In den Genomen von Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen wurden diese Faktoren in einer wirts-, nicht aber symbiontenspezifischen Variante identifiziert (Sommer et al, 2007). Andere Mechanismen, wie beispielsweise eine direkt an die Translokation anschließende De-Ubiquitinierung oder die Modifikation von proteasomalen Rekrutierungsfaktoren, stellen weitere Möglichkeiten dar, um die proteasomale

Degradation von SELMA-Substraten im PPC initial bzw. in rezenten Cryptophyten zu verhindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der Evolution der Translokationsapparat des genuinen ERAD-Systems des Symbionten in die zweite Plastidenmembran relokalisiert wurde. Durch Modifikationen bei der Substraterkennung und die Verhinderung der proteasomalen Degradation im periplastidären Kompartiment wurde die Umfunktionierung dieser ursprünglichen ERAD-Maschinerie zum Präproteintranslokator SELMA möglich.

3.3 SELMA und die Chromalveolaten-Hypothese

Vor etwa 10 Jahren wurde von Cavalier-Smith die Chromalveolaten-Hypothese aufgestellt, die postuliert, dass Heterokontophyten, Haptophyten und Cryptophyten (Chromista) sowie die Apikomplexen, Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Ciliaten (Alveolata) einen monophyletischen Ursprung haben und auf eine singuläre sekundäre Endosymbiose zurückgehen, bei der eine Rotalge von einer eukaryoten Wirtszelle aufgenommen und als Symbiont etabliert wurde (Cavalier-Smith, 1999) (vgl. Abschnitt 1.1.3). Ein Grundgedanke dieser Hypothese besteht darin, dass die Anpassungen von Wirt und Symbiont derart komplex sind, dass vergleichbare Vorgänge nur selten stattgefunden haben. Der Transfer hunderter symbiontenspezifischer Gene in den Nukleus der Wirtszelle sowie die daraus resultierende Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Proteintransportsysteme sind grundlegende Anpassungen bei der Etablierung eines Organells.

Phylogenetische Analysen symbiontenspezifischer Gene haben die Chromalveolaten-Hypothese bislang überwiegend unterstützt und zeigen im Ganzen, dass es sich bei Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten, Apikomplexen und Peridinin-haltigen Dinoflagellaten möglicherweise um denselben Symbiont handeln könnte. Genverluste, Genduplikationen und der Transfer von spezifischen Genen werden bei diesen Untersuchungen berücksichtigt (Fast et al, 2001; Hagopian et al, 2004; Harper & Keeling, 2003; Patron et al, 2004; Yoon et al, 2002). In den letzten zwei Jahren wurden verschiedene Chromalveolaten-Genome sequenziert, so dass auch auf Ebene des Wirtes

vergleichende Analysen möglich wurden. Phylogenetische Untersuchungen verschiedener wirtsspezifischer Gene legen demzufolge allerdings nahe, dass es sich bei den Chromalveolaten ursprünglich um unterschiedliche Wirte gehandelt hat und der Ursprung dieser Organismen folglich nicht monophyletisch ist (Hackett et al, 2007; Okamoto et al, 2009; Patron et al, 2007). Cryptophyten und Haptophyten zeigen dabei in jedem Fall einen gemeinsamen Ursprung, während Heterokontophyten und Alveolaten einen anderen, doch vermutlich ebenfalls gemeinsamen Ursprung haben (Burki et al, 2008; Felsner et al, 2009; Harper et al, 2005; Rice & Palmer, 2006). Im Ganzen ist festzuhalten, dass die phylogenetischen Daten unterschiedlich interpretiert und in jedem Fall kontrovers diskutiert werden (Archibald, 2009; Keeling, 2009). Um den abweichenden Ergebnissen symbiontenspezifischer und wirtsspezifischer Analysen zu begegnen, wurde von Sanchez-Puerta und Delwiche kürzlich postuliert, dass Heterokontophyten und Alveolaten erst später im Rahmen einer oder mehrerer tertiärer Endosymbiosen mit einer Cryptophyte oder Haptophyte entstanden sind (Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008). Auf phylogenetischer Basis ist diese Hypothese allerdings schwer zu prüfen.

Unabhängig von komplexen phylogenetischen Analysen eröffnet das in dieser Arbeit beschriebene Proteintransportsystem SELMA eine weitere Möglichkeit, die Verwandtschaftsverhältnisse der Chromalveolaten zu diskutieren.

Datenbankanalysen haben gezeigt, dass zentrale Komponenten des symbiontenspezifischen ERAD-ähnlichen Systems in Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen erhalten wurden (Sommer et al, 2007). Da in allen diesen Organismen das ER des Endosymbionten eliminiert wurde, ist davon auszugehen, dass das System eine modifizierte Funktion erfüllt, und so wurde 2007 postuliert, dass es sich um den Präproteintranslokator der zweiten Plastidenmembran handelt (Sommer et al, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben diese Hypothese in der Diatomee *P. tricornutum* experimentell untermauert. Offensichtlich handelt es sich bei SELMA folglich um ein konserviertes System, bei dem die ursprüngliche ERAD-Transportmaschinerie des Symbionten im Zuge der Endosymbiose relokalisiert, recycelt und zum Präproteintransporter umfunktioniert wurde.

SELMA scheint die Chromalveolaten-Hypothese zunächst zu stützen, da es – wenn auch nicht unmöglich – doch relativ unwahrscheinlich ist, dass das symbiontenspezifische

ERAD-System in den beschriebenen Organismen unabhängig voneinander zum Präproteintransporter umfunktioniert wurde. So wurde SELMA möglicherweise in einem gemeinsamen Vorläufer der Chromalveolaten etabliert und konserviert (Abb. 3-3). Andererseits könnte die Konservierung von SELMA natürlich auch im Rahmen einer tertiären Symbiose erklärt werden. Folgt man dem Modell von Sanchez-Puerto und Delwiche könnte SELMA zunächst im Vorläufer der Cryptophyten und Haptophyten etabliert und anschließend in einer tertiären Symbiose an Heterokontophyten und Apikomplexe weitergegeben worden sein. Der Erhalt dieses bereits etablierten Transportsystems ist in diesem Rahmen naheliegend (Abb. 3-3). Die unabhängige Etablierung von SELMA in den verschiedenen Linien der Chromalveolaten kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, würde jedoch postulieren, dass das symbiontenspezifische ERAD-System der Rotalge für diese Art der Umfunktionierung prädestiniert ist, so dass es sich bei allen Organismen mit dieser Ähnlichkeit entwickelt hat.

Phylogenetische Analysen der wirtsspezifischen ERAD-Faktoren und der SELMA-Faktoren von Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen liefern vergleichbare Ergebnisse wie aktuelle Phylogenien anderer genetischer Marker und machen einen monophyletischen Ursprung der Chromalveolaten unwahrscheinlich. Während das symbiontenspezifische System SELMA von einer Rotalge abstammt, legen die wirtsspezifischen ERAD-Faktoren einen gemeinsamen Ursprung für Cryptophyten und Haptophyten und eine Verwandtschaft mit der grünen Linie nahe, jedoch einen davon unabhängigen Wirt im Falle der Heterokontophyten, Apikomplexen und Ciliaten (Felsner et al, 2009).

Möglicherweise werden durch weitere Genomprojekte und phylogenetische Analysen, aber vor allem auch neue funktionelle Marker, wie das SELMA-System, die Verwandtschaftsverhältnisse der Chromalveolaten in den nächsten Jahren deutlicher. Schlussendlich ist in jedem Fall eine Kombination unterschiedlicher vergleichender Analysen notwendig, um die phylogenetischen Zusammenhänge aufzuklären.

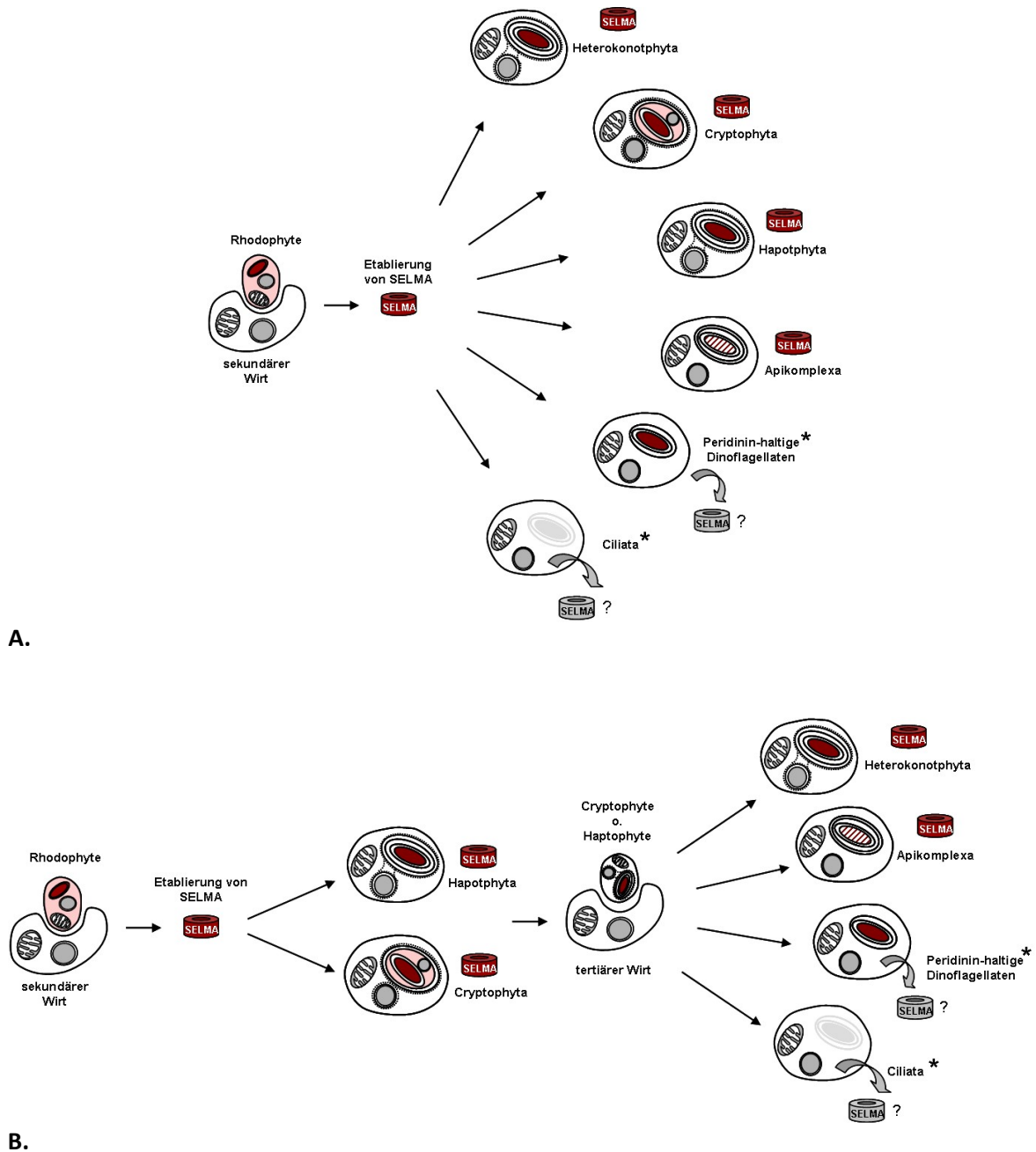


Abb. 3-3: Das SELMA-System als phylogenetischer Marker - Modelle für die Evolution der Chromalveolaten. Das Recycling des symbiontenspezifischen ERAD-Systems und die Umfunktionierung zum Präproteintranslokator der zweiten Plastidenmembran hat vermutlich initial nur einmal stattgefunden. Basierend auf dieser Annahme sind zwei der zuvor postulierten Modelle mit der Evolution von SELMA vereinbar. **A. Die Chromalveolaten-Hypothese.** Die Konservierung des SELMA-Systems in Heterokontophyten, Cryptophyten, Haptophyten und Apikomplexen unterstützt die ursprüngliche Chromalveolaten-Hypothese von Cavalier-Smith (1999). Das Modell ist allerdings nicht mit aktuellen phylogenetischen Analysen vereinbar. **B. Modell nach der Hypothese von Sanchez-Puerto und Delwiche.** Das SELMA-System wurde zunächst im Vorläufer der Cryptophyten und Haptophyten etabliert und anschließend im Rahmen einer oder mehrerer tertiärer Endosymbiosen weitergegeben.

* In Peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Ciliaten wurden bislang keine SELMA-Komponenten identifiziert. Da Dinoflagellaten das Äquivalent der zweiten Plastidenmembran vermutlich verloren haben und in Ciliaten die komplexe Plastide an sich eliminiert wurde, ist ein Erhalt von SELMA aber unwahrscheinlich.

3.4 Aus Alt mach´ Neu: Recycling als Evolutionsprinzip

Eine evolutionäre Betrachtung eukaryoter Proteintranslokatoren zeigt, dass es sich bei vielen dieser Systeme um ursprünglich bakterielle Maschinerien handelt, die recycelt und modifiziert und mit eukaryoten Elementen kombiniert wurden (Übersichtsartikel: Pohlschroder et al, 2005; Tartakoff & Tao, 2009).

Eines der am besten untersuchten und vermutlich ursprünglichsten Proteintranslokationssysteme ist der SecYEG Apparat der inneren Membran gram-negativer Bakterien. Das System dient zur Sekretion bakterieller Proteine in den Intermembranraum und ist in Eukaryoten als Sec61-Komplex der ER-Membran hoch konserviert (Driessen & Nouwen, 2008; Hartmann et al, 1994; Osborne et al, 2005; Rapoport, 2007).

Auch die TOC/TIC-Maschinerie der primären Plastiden ist gut untersucht und Sequenzvergleiche sowie strukturelle Analysen belegen, dass Toc75, der Translokationskanal der äußeren Plastidenmembran, sowie einige Proteine des TIC-Komplexes (Tic20, Tic22 und Tic55) auf den prokaryoten Symbionten zurückgehen (Bölter et al, 1998; Reumann et al, 1999). Andere Komponenten, wie die Toc159 GTPase, sind hingegen von eukaryotem Ursprung (Reumann & Keegstra, 1999), während es sich bei Toc34 möglicherweise sogar um ein chimäres Protein mit pro- und eukaryoten Domänen handeln könnte (Cavalier-Smith, 2000). Bei den Transportsystemen der Thylakoidmembranen, wie dem TAT-Transporter und dem Sec-System für den Import luminaler Proteine sowie dem Alb3 System für die Integration thylakoidaler Membranproteine, handelt es sich ebenfalls um prokaryote Maschinerien, die in der inneren Membran gram-negativer Bakterien ihren Ursprung haben (Gutensohn et al, 2006). Im Gegensatz zum plastidären TOC/TIC-System geht das Präproteintransportsystem der Mitochondrien (TOM/TIM-System) vermutlich auf eine analoge und somit neue Entwicklung im eukaryoten System zurück. Obwohl das System viele mechanistische Parallelen zum plastidären Transportsystem aufweist, wurden für den eigentlichen Translokationsapparat bislang keine homologen Proteine in Prokaryoten identifiziert (Dolezal et al, 2006). Auch bei der Translokationsmaschinerie des ERAD-Systems könnte es sich um eine eukaryote Entwicklung handeln. Ein prokaryoter Ursprung ist hier nicht bekannt. Interessanterweise deuten jedoch phylogenetische

Untersuchungen des peroxisomalen Importapparates auf eine Verwandtschaft zu ERAD-Komponenten hin und lassen die Vermutung zu, dass der ERAD-Translokationsapparat innerhalb der Eukaryoten bereits recycelt wurde (Gabaldon et al, 2006).

Im Rahmen sekundärer Endosymbiosen wurden phototrophe Eukaryoten von eukaryoten Wirtszellen aufgenommen, stabil integriert und bis zum Organell reduziert. Dieser Prozess machte erneut die Entwicklung von Proteintransportsystemen notwendig und hat mindestens dreimal unabhängig stattgefunden (vgl. Abschnitt 1.1.2). Da auf diese Weise Organelle entstanden, die von drei bzw. vier Membranen umgeben sind, scheint die Entwicklung von Transportmechanismen ungleich komplexer. Es zeigt sich jedoch, dass auch in diesen Organismen zum größten Teil bestehende Systeme recycelt und modifiziert wurden. So erfolgt in der Diatomee *P. tricornutum* der Transport über die äußerste Plastidenmembran über den Sec61-Komplex (Bolte et al, 2009). Da die Plastide im ER der Wirtszelle liegt, kann der bestehende ko-translationale Transportweg genutzt werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, wird der Transport an der zweiten Plastidenmembran durch das SELMA-System vermittelt, das auf das ursprüngliche ERAD-Translokationssystem des Symbionten zurückgeht (Hempel et al, 2009). Im Rahmen der Endosymbiose wurde das System offensichtlich relokalisiert und zum Präproteintranslokator umfunktioniert. Die Identifizierung eines Toc75-Homolog in der dritten Plastidenmembran von *P. tricornutum* impliziert einen TOC/TIC-vermittelten Mechanismus an Membranen drei und vier und lässt vermuten, dass dieses bereits in der primären Symbiose entwickelte System mit geringen Modifikationen erhalten wurde (Bullmann et al, 2009).

Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass der Proteinimport in komplexe Plastiden der Haptopyhten, Cryptophyten und Apikomplexen ähnlich abläuft (Hempel et al, 2007), wenn auch in Apikomplexen die äußerste Plastidenmembran nicht der ER-Membran entspricht, sondern zunächst über den sekretorischen Weg angesteuert wird (vgl. Abschnitt 1.2.2). Im Folgenden wird es interessant sein zu untersuchen, wie bei den Chlorarachniophyten, die eine vergleichbare Membranorganisation besitzen, aber im Rahmen einer unabhängigen Symbiose mit einer Grünalge entstanden sind, der Präproteintransport an der zweiten Plastidenmembran abläuft. Zudem sind die Transportmechanismen in komplexe Plastiden mit drei Hüllmembranen bislang nur

unzureichend geklärt. Dinoflagellaten und Euglenophyten, die in unabhängigen Endosymbiosen mit einer Rotalge bzw. einer Grünalge entstanden sind, haben vermutlich das Äquivalent zur zweiten Plastidenmembran der Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen im Laufe der Endosymbiose eliminiert (Cavalier-Smith, 1999; Cavalier-Smith, 2003).

4 Zusammenfassung

Diatomeen spielen bei der globalen Kohlenstofffixierung eine maßgebliche Rolle und stellen als Hauptbestandteil des Phytoplanktons einen Großteil der marinen Biomasse dar. Wie viele andere Algengruppen, aber auch beispielsweise humanpathogene Organismen, wie der Malariaerreger *P. falciparum*, sind Diatomeen im Rahmen einer sekundären Endosymbiose entstanden, bei der eine Rotalge von einer eukaryoten Wirtszelle aufgenommen und zur komplexen Plastide reduziert wurde. Vergleichbar mit der Entstehung primärer Plastiden mussten in der Folge Transportmechanismen entwickelt werden, um Präproteine zurück in die Plastide über nun allerdings nicht zwei, sondern drei bzw. vier Membranen zu transportieren. Wie die Zelle dieses Problem mechanistisch gelöst hat, war lange Zeit unklar und wurde im Rahmen verschiedenster Modelle diskutiert.

2007 wurde auf theoretischer Basis postuliert, dass der Präproteintransport an der zweiten Plastidenmembran von Heterokontophyten, Haptophyten, Cryptophyten und Apikomplexen durch ein ERAD-ähnliches Transportsystem vermittelt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Hypothese in der Diatomee *P. tricornutum* erstmals experimentell untermauert werden. Es wurde gezeigt, dass die symbiontenspezifischen ERAD-Faktoren sDer1-1 und sDer1-2 einen oligomeren Komplex in der zweiten Plastidenmembran bilden und mit den Transitpeptiden periplastidärer Präproteine interagieren. Der sDer1-Komplex spielt dabei als potentiell kanalbildende Komponente eine zentrale Rolle des symbiontenspezifischen ERAD-ähnlichen Systems SELMA. Zusätzlich findet am sDer1-Komplex eine Unterscheidung stromaler und periplastidärer Präproteine statt. So wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass Transitpeptide periplastidärer nicht aber stromaler Präproteine mit den Proteinen sDer1-1 und sDer1-2 interagieren. Untersuchungen mit mutagenisierten Transitpeptiden zeigten zudem, dass alleine die +1 Position des Transitpeptids, besetzt mit einer aromatischen bzw. nicht-aromatischen Aminosäure, für diese Unterscheidung am sDer1-Komplex kritisch ist. Mit der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3 wurde ein Kandidat für ein weiteres Schlüsselement von SELMA identifiziert.

Im Ganzen zeigt sich damit, dass das symbiontenspezifische ERAD-Translokationssystem im Zuge der Endosymbiose von der ER-Membran in die zweite Plastidenmembran relokalisiert und zum Präproteintranslokator SELMA umfunktioniert wurde.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich oder Merck bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt und gelagert.

e64d	Peptide Institute Inc.
Digitonin	Calbiochem
Luminol	Roth
Spermidin	Fluka
Tropic marin Meersalz	Dr. Biener GmbH
Zeocin	InvivoGen

5.1.2 Geräte

PCR-Thermocycler

MastercyclerGradient	Eppendorf
MastercyclerPersonal	Eppendorf

Zentrifugen

Optima™ L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf

Inkubation

Klimaschrank MLR-350 SANYO	Ewald GmbH
Schüttler Certomat R	Braun Biotech International
Thermomixer Comfort	Eppendorf
TRM-V Taumelschüttler	MAGV

Sequenzier-Automaten

ABI 377	Applied Biosystems
---------	--------------------

Biolistische Transfektion

Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad
--	--------

Sonstige Geräte

Geldokumentationssystem Geldoc 1000	Biorad
Frenchpress SLM-AMINCO 4-3399	SLM-AMINCO Instruments
KLSM Leica TCS SP2	Leica-Mikrosystems
Mikrotom Ultracut	Reichert-Jung
Nanodrop Spectrophotometer ND100	PeqLab
Spektralphotometer Ultrospec 2000	GE-Healthcare
TE 77 Semi-dry Transfer Unit	GE-Healthcare
Transmissionselektronenmikroskop EM301	Philips
UV-Schirm Spectroline M730 Longlife TM Filter	Spectronics Cooperation
Ultra-low freezer –85	NewBrunswickScientific

5.1.3 Membranen, Filter und Photomaterialien

Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell
FP 30/0.2 CA-S - 0.2µm Sterilfilter	Schleicher & Schuell
Fuji-Medical-X-ray-Film, 30 x 40 cm	Fuji Film
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak

5.1.4 Software- und Internetanwendungen

Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Sequencher der Firma GeneCodes bearbeitet. Für vergleichende Sequenzanalysen auf Aminosäureebene wurden die Programme ClustalX (Jeanmougin et al, 1998) und Genedoc (Nicholas et al, 1997) verwendet. Die Bearbeitung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Leica Confocal Software (LCS) von Leica.

Für *in silico* Analysen wurden vor allem folgende Internetanwendungen genutzt:

BlastN, BlastP, tBlastX	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
EhuxDBv1.0	http://genome.jgi-psf.org/Emihu1/Emihu1/
Expasy	http://www.expasy.ch
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PhatrDBv2.0	http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/
PlasmoDBv6.1	http://plasmodb.org/plasmo/
Saccharomyces Genome Database	http://www.yeastgenome.org/
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SOSUIv1.11	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
ThapsDBv3.0	http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/
TMHMM v2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
ToxoDBv5.2	http://www.toxodb.org/toxo/

5.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook et al, 1989). Die Zusammensetzung weiterer Puffer, Lösungen sowie der Kulturmedien ist den entsprechenden Methodenteilen zu entnehmen.

5.1.6 Molekularbiologische Kits

CloneJet™ PCR Cloning Kit	MBI-Fermentas
DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia
Glutathione Sepharose 4B	GE-Healthcare
JETsorb DNA Extraction Kit	Genomed
KAPA2G Robust PCR Kit	PEQLAB
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Finnzymes
Protein A Agarose beads	ThermoScientific
QIAGEN Plasmid Purification Midi/ Maxi Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	MBI-Fermentas
Superscript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen

Ubiquitylation Kit UW9920

EnzoLifeScienes

5.1.7 Enzyme

Alle nicht aufgeführten Enzyme wurden von MBI-Fermentas bezogen.

Inorganic pyrophosphatase, IPP	Fluka
Lysozym	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas
Superscript III® Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Biotoools

5.1.8 Längen- und Molekulargewichtstandards

Folgende Längen- und Molekulargewicht-Standards wurden von MBI-Fermentas bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt: GeneRuler™ Express DNA Ladder, PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

5.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen und auf eine Konzentration von 5 pmol/µl eingestellt. Die Nukleotidsequenzen sind von 5' → 3' Richtung angegeben; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Konstruktspezifische Oligonukleotide:

s_Der1-1 fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTC</u> ATGAAGTCGTC AACCTTAGTG
s_Der1-1 fw <i>SpeI</i>	ACTAGTATGAAGTCGTC AACCTTAGT
s_Der1-1 FL rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> TCCACCAAGCTTATGACCCTTG
s_Der1-1 BTS rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> GGTATCTGAGAGAGCAGACTTC
s_Der1-1-C rv <i>BglII</i>	<u>AGATCT</u> CGGCATAGCTCGACTGAGAACG
s_Der1-2 fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTC</u> ATGAGTACATTCTATAGTTTGC
s_Der1-2 fw <i>SpeI</i>	ACTAGTATGAGTACATTCTATAGTTTGC
s_Der1-2 FL rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> CATTTCAAAGTCGGACGAAATAGG
s_Der1-2 BTS rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> GGGATCAACGGTATTGTCTTCGGC
s_Der1-2-C rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> GCGACTCCAATGTAAACCAAAAATG
h_Der1-2 fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTC</u> ATGCCGTTTGCTCAACC
h_Der1-2 rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> ATCTCGTCCCAAAGGGC
AtpC fv-F <i>SpeI</i>	ACTAGTATGAGATCCTTTTGCATCGCAGCCCTTTTGCTGTGGCATCTGCCGCC ACCACA
AtpC fw <i>SpeI</i>	<u>ACTAGT</u> ATGAGATCCTTTTGCATCGC
AtpC fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTC</u> ATGAGATCCTTTTGCATCGCAGC
AtpC rv BTS <i>BamHI</i>	<u>GGATCC</u> TCCATCCATGACAATCGTTGC

FcpD fw <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGAAGACTGCTGTCATTGCCTC</u>
FcpD rv BTS <i>BamHI</i>	<u>GGATCCGGTGGTGGCAACCGAAGTACGGG</u>
Hsp70 fw + F <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGGTGCATCTTCCATCCTCCTCCACCCTCCTAACCTGCGTGTCCGTA</u> <u>CTTCTCTCCGGAGCTCACCCCGCAAAAGCATTTTGGCTA</u>
Hsp70 fw <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGGTGCATCTTCCATCCTCCTCC</u>
Hsp70 fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGGTGCATCTTCCATCCTCCTCC</u>
Hsp70 BTS rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCCTTTGTTGTCTGCATTACTGGC</u>
s_Cdc fw BTS <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGGTCTTTTCGAGACCATGCCTGCTGGTAC</u>
s_Cdc rv BTS <i>BamHI</i>	<u>GGATCCTTGATCCTTTTGGACTTTTTC</u>
Fos fw <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCTTATGGCCATGGAGGC</u> <u>CCGCATTC</u>
Fos rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCCGTGGTTCATGACTTTCTGTTTCAGGTGC</u>
Jun fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAACTTGCGGCCGCGAACTC</u>
Jun rw <i>BamHI</i>	<u>GGATCCGGTGGCGATGGATCTCGATCCTCTAG</u>
PDI fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGACTGCAATAGGGTCTTTTCGG</u>
PDI fw <i>SpeI</i>	<u>ACTAGTATGACTGCAATAGGGTCTTTTCGG</u>
PDI rv <i>BglII</i>	<u>AGATCTCAATTCGCCTTCATCAAAAAGATCC</u>
s_E3 fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGATTGGAACCAACCGTTGG</u>
s_E3 rv <i>BglII</i>	<u>AGATCTCACCGACTCTTGTCTCGAAGG</u>
s_E3 pGEX fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGATTGGAACCAACCGTTGG</u>
s_E3 pGEX CT fw <i>EcoRI</i>	<u>GAATTCATGCCCCGATCCGGACGATC</u>
s_E3 pGEX FL rv <i>NotI</i>	<u>GCGGCCGCTTACACCGACTCTTGTCTCGAAGG</u>
s_E3 intern rv <i>BamHI</i>	<u>GGATCCGTTGTCTTGTTCGTATCGAAC</u>
s_E3 intern fw <i>PstI</i>	<u>ACATGCTGACATTCCTCTATATTCTAC</u>
s_E3 rv <i>HindIII</i>	<u>AAGCTTTACACCGACTCTTGTCTCGAAG</u>
N-GFP fw <i>BamHI</i>	<u>GGATCCCCCGAGGAGGAGGACCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC</u>
N-GFP rv <i>SacII</i>	<u>CCGCGGTTAGGCCATGATATAGACGTTGTGGC</u>
C-GFP fw <i>BamHI</i>	<u>GGATCCATGCCCGAGGAGGAGGACCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG</u> <u>GG</u>
C-GFP rv <i>HindIII</i>	<u>AAGCTTACCTGTACAGCTCGTCCATGC</u>
GFP 1-10 fw <i>BamHI</i>	<u>GGATCCATGGGTGGCACCAGTAGCAAAGGAG</u>
GFP 1-10 rv <i>SacII</i>	<u>CCGCGGTTAGGTACCCTTTTCGTTGGG</u>
GFP 11 fw <i>BamHI</i>	<u>GGATCCGGTGGAGGGTC</u>
GFP 11 rv <i>HindIII</i>	<u>AAGCTTGGTACCTTATGTAATCCCAGC</u>
GFP 11 rv <i>NcoI</i>	<u>CCATGGATGTAATCCCAGCAGCATTTACG</u>

Oligonukleotide für die Sequenzierung:

pGEX fw	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX rv	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
pJet fw	GCACAAGTGTTAAAGCAGTT
pJet rv	CTCTCAAGATTTTCAGGCTGTAT
pPhaT1 fw	AAGAGTGCTCGTGTTGCTTCG
pPhaT1 rv	GCGGCACAAATGGGCATCCTTGCTC
pPhaNR fw	GGTCGGGTTTCGGATCCTTCC
pPhaNR rv	GATGAACATAAAACGACGATGAG
N-GFP raus	CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC
C-GFP raus	CGACCACTACCAGCAGAACACCCCC
GFP 11 raus	TGTAATCCCAGCAGCATTTAC
GFP 1-10 raus	TTTGTGCCCATTAAACATCACC

5.1.10 Vektoren

pJet 1.2	Amp ^r , P _{T7} , <i>eco47IR</i>	MBI-Fermentas
pGEX-5x-3	Amp ^r , P _{tac} , N-GST Tag	GE-Healthcare
pPha-T1	Amp ^r , Zeo ^r , P _{fcpA} , + T _{fcpA}	Zaslavskaja et al. 2000
pPha NR	Amp ^r , Zeo ^r , P _{NR} + T _{NR}	modifizierter pPha-T1
pPha[DUAL]2xNR	Amp ^r , Zeo ^r , P _{NR} +T _{NR} (für MCS I+II)	modifizierter pPha-T1

5.1.11 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden im Folgenden unter Angabe der anwendungsspezifischen Verdünnungen aufgelistet.

Primäre Antikörper: α Pt_sDer1-1 (Peptidantikörper von Eurogentec gegen das Epitop RRLDPDSKDAARES, WB: 1:1000), α Pt_sDer1-2 (Peptidantikörper von Eurogentec gegen das Epitop RIRSEYKPISSDFEM, WB: 1:500), α Pt_sHrd1 (Peptidantikörper von Eurogentec gegen das Epitop: CPSISPDPPSRQESV, WB: 1:500), α GFP (Biomol, WB: 1:3000), α BiP (Abcam, WB: 1:1000), α GST (GE-Healthcare, WB: 1:3000), α His (Clontech, WB: 1:5000).

Sekundäre Antikörper: α rabbit HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich), α goat HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich), α Mouse HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich), α rabbit an 30 nm Goldpartikel gekoppelt (Biocell).

5.1.12 Organismen

In dieser Arbeit wurde mit dem *Phaeodactylum tricornutum* Stamm CCAP1055/1 gearbeitet.

Bakterienstämme:

E. coli TOP10 (Invitrogen): F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139 Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG.

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene): F⁻, ompT, hsdS(rB⁻mB⁻), dcm⁺, Tet^r, gal, λ(DE3), endA, Hte, [argU, ileY, leuW, Cam^r].

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung der Organismen

5.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung der Diatomee *P. tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum wurde in f/2-Medium bei 22 °C im Klimaschrank MLR-350 SANYO unter Dauerlicht (8.000 - 11.000 Lux) kultiviert. Flüssigkulturen wurden in einem Volumen von 50 - 1000 ml bei 150 rpm geschwenkt. Zur Kultivierung auf Platten wurde dem Medium 1.5 % Agar zugesetzt. Die Stammhaltung transfizierter Klone erfolgte auf f/2-Platten mit 75 µg/ml Zeocin. Die Kulturen wurden alle vier Wochen auf frische Platten überimpft.

f/2-Medium

Tropic marine Meersalz	1,6 % (w/v)
Tris/HCL pH 8	2 mM
NaNO ₃ bzw. NH ₄ Cl	0.9 mM bzw. 1.5 mM
NaH ₂ PO ₄	36 µM

*f/2-Spurenelementlsg.

FeCl ₃	11,65 mM
Na ₂ EDTA	11.71 mM
CuSO ₄	39 µM
ZnSO ₄	77 µM
CoCl ₂	42 µM
Na ₂ MoO ₄	26 µM

*f/2-Vitaminsstocklsg.

Biotin	2 µM
Cyanocobalmin	0.37 µM
Thiamin-HCl	297 µM

*Vitamin- und Spurenelement-Lösungen wurden dem Medium kurz vor Gebrauch steril zugesetzt (1:1000).

5.2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme TOP10 und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurden gemäß Herstellerangaben (Invitrogen bzw. Stratagene) bei 37 °C in flüssigem LB-Medium (Sambrook et al, 1989) in der Regel über Nacht kultiviert. Zur Kultivierung auf Platte wurde dem Medium 2 % Agar zugesetzt. Selektionsmedien wurden durch Zugabe entsprechender Antibiotika hergestellt. Die Stammhaltung erfolgte als LB/Glycerin-Gemisch (1:1) bei -80 °C.

5.2.2 Nukleinsäure-Analytik

5.2.2.1 DNA- und RNA-Isolierung aus *P. tricornutum*

Genomische DNA von *P. tricornutum* wurde mittels der CTAB-Methode von Doyle & Doyle isoliert (Doyle & Doyle, 1990). Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe von *TRIOZOL*TM-Reagenz nach Herstellerangaben (Invitrogen). Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mit Hilfe eines Nanodrop Spektrophotometers bestimmt

5.2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde standardmäßig mittels alkalischer Lyse nach Sambrook et al (1989) isoliert. Für die Transfektion von *P. tricornutum* wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des *QIAGEN® Plasmid Purification Midi Kit* nach Herstellerangaben isoliert.

5.2.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Standard-PCR-Bedingungen nach Saiki et al. unter Verwendung des *Phusion Polymerase Kit* der Firma Finnzymes (Saiki et al, 1985). Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 25 µl. Annealingtemperatur, Elongationszeit sowie MgCl₂ Konzentration wurden den Anforderungen jeder Amplifikation entsprechend angepasst. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus *P. tricornutum* Kolonien (Kolonie PCR) wurde das *KAPA2G Robust PCR Kit* der Firma PEQLAB verwendet. Eine *P. tricornutum* Kolonie wurde in 30 µl ddH₂O resuspendiert, 10 min bei 96 °C inkubiert und anschließen 5 min bei 20.000 x g abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 µl als DNA-Ausgangsmaterial in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

5.2.2.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von RNA erfolgte mit dem *Superscript® III Reverse Transcriptase Kit* der Firma Invitrogen unter Verwendung eines genspezifischen 3'-Primers. Pro Reaktion wurden ca. 500 ng RNA eingesetzt. Die so gewonnene cDNA wurde anschließend als Ausgangsmaterial für eine Standard-PCR eingesetzt.

5.2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte nach Sambrook et al (1989) in TBE-Agarosegelen. Die Gele wurden je nach Größe des DNA-Fragments mit einer Agarosekonzentration von 0.8-2 % hergestellt und enthielten 3.75 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA am UV-Schirm. Als DNA-Längenstandard wurde *GeneRuler™ Express DNA Ladder* der Firma Fermentas aufgetragen. Zur Elution der DNA aus Agarosegelen wurde das *JETsorb DNA Extraction Kit* der Firma Genomed nach Herstellerangaben verwendet.

5.2.2.6 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas. In einem Standardrestriktionsansatz wurde ca. 1 µg DNA mit jeweils 1 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen für 1 h bei 37 °C unter spezifischen Pufferbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Restriktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA mit Hilfe des *JETsorb DNA Extraction Kit* eluiert.

5.2.2.7 Ligation von DNA Fragmenten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *CloneJET™ PCR Cloning Kit* der Firma Fermentas in den Vektor pJet1.2/blunt ligiert. Ligationsreaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation zuvor restringierter DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des *Rapid DNA Ligation Kit* der Firma Fermentas. Ligationsprodukte wurden anschließend in den *E. coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) transformiert.

5.2.2.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels Cycle Sequencing nach der Methode des Kettenabbruchs (Sanger et al, 1977) und wurde unter Verwendung des *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* der Firma GE-Healthcare durchgeführt. Ein Sequenzierungsansatz bestand aus ca. 1 µg Plasmid-DNA, 5 pmol Sequenzierprimer und 2 µl ABI-Mix und wurde auf ein Endvolumen von 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die

Sequenzierreaktion wurde mit folgendem Standard-Programm durchgeführt. Einer initialen Denaturierung von 3 min bei 95 °C folgten 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 sec, 95 °C), Primer-Annealing (30 sec, 50 °C) und Elongation (90 sec, 60 °C). Zum Schluss folgte eine finale Elongation für 30 sec bei 60 °C. Zur Fällung der DNA wurden dem Ansatz anschließend 26 µl ddH₂O und 64 µl unvergällter EtOH zugegeben. Die DNA wurde gefällt, gewaschen und im Vakuum getrocknet und anschließend in 3 µl ABI-Loading Dye resuspendiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktion erfolgte mit dem Sequenzier-Automaten ABI377 der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Sequencher der Firma Genecodes.

5.2.2.9 Transformation der *E. coli* Stämme TOP10 und BL21

E. coli TOP10-Zellen wurden von der Firma Invitrogen bezogen und mittels der RbCl₂-Methode kompetent gemacht (siehe Protokoll unten). Für die Transformation wurden 30 µl kompetente Zellen zu 50 ng Plasmid-DNA bzw. zu einem Ligationsansatz zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (40 sec, 42 °C) wurden die Zellen nochmals 5 min auf Eis inkubiert, mit 1 ml LB aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Transformation des *E. coli* Stamms BL21-CodonPlus(DE3)-RIL der Firma Stratagene erfolgte nach Herstellerangaben.

Herstellung kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen mittels RbCl₂: 100 ml Bakterienkultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Zugabe von jeweils 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 unter genannten Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 33 ml Puffer RF1 resuspendiert und nochmals 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und anschließend in 5 ml Puffer RF2 resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

<u>Puffer RF1*</u>		<u>Puffer RF2*</u>	
RbCl ₂	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂	50 mM	RbCl ₂	10 mM
KAc	30 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	Glycerin	15 % (w/v)
Glycerin	15 % (w/v)		

* Der pH von Puffer RF1 wurde mit 0.2 M Essigsäure auf 5.8 eingestellt; der pH von Puffer RF2 mit NaOH auf 5.8 eingestellt. Beide Puffer wurden anschließend steril filtriert.

5.2.2.10 Transfektion von *P. tricornutum*

P. tricornutum wurde mittels biolistischer Transfektion nach einem modifizierten Protokoll von Apt et al transfiziert (Apt et al, 1996). Als Mikrocarrier wurden M 10 (Ø 0.7 µm) Tungsten-Partikel verwendet und wie folgt vorbereitet. 60 mg Mikrocarrier wurden mit 1 ml 100 % EtOH (HPLC Qualität) gewaschen (5 min vortexen), pelletiert und weitere 2 x mit 1 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Final wurden die Carrier in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und zu 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Für die Transfektion wurden *P. tricornutum* Zellen einer ca. 7 Tage alten Flüssigkultur durch Zentrifugation geerntet (5 min, 1.500 x g). Pro Transfektion wurden 10⁸ Zellen in einem Volumen von 100 µl mittig auf einer f/2-Platte (Ø 8,5 cm) ausgestrichen. Anschließend wurde die DNA des Transfektionskonstruktes an die Mikrocarrier gebunden. Pro Transformationsansatz wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zusammen gegeben: 50 µl Mikrocarrier, 5 µg des Transformationskonstruktes, 50 µl 2.5 M CaCl₂ und 20 µl 0.1 M Spermidin. Der Ansatz wurde 1 min gevortext und zur Sedimentation 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel in 250 µl 100 % EtOH (HPLC Qualität) aufgenommen und 30 sec gevortext. Nach erneuter Sedimentation wurde das Pellet nochmals in 50 µl frischem 100 % EtOH aufgenommen. Die Transfektion wurde direkt im Anschluss gestartet. Die biolistische Transfektion erfolgte mit dem *Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System* der Firma Biorad. Pro Transfektionskonstrukt wurden drei Transfektionsschüsse durchgeführt. Dazu wurden je 10 µl der Microcarrier-DNA-Suspension auf den Macrocarrier mittig aufgebracht. Anschließend wurde das System nach Herstellerangaben zusammengebaut. Die Einlegeplatte mit dem Macrocarrier wurde

in Position 1 installiert. Die f/2-Agarplatte mit den zu transformierenden Zellen wurde direkt darunter in Position 2 angebracht. Die biolistische Transfektion fand im Vakuum bei -25 psi statt. Auf die Rapture Disk wurde ein Druck von 1350 psi ausgeübt. Anschließend wurde die Platte mit den transformierten Zellen 24 h im Dauerlicht (8.000 - 11.000 Lux) bei 22 °C im Klimaschrank MLR-350 SANYO inkubiert, bevor die Zellen mit 1 ml f/2-Medium von der Platte abgeschwemmt und zu gleichen Anteilen auf 3 frischen Zeocin-haltigen f/2-Platten verteilt wurden. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und ca. zwei Wochen unter genannten Kulturbedingungen inkubiert, bis erste Kolonien wuchsen.

M 10 (Ø 0.7 µm) Tungsten-Partikel	Biorad
Rapture Disks 1350 psi	Biorad
Macrocarrier	Biorad
Hepta stopping screens	Biorad

5.2.3 Protein-Analytik

5.2.3.1 Herstellung von *P. tricornutum* Proteinextrakt

Zur Herstellung von Proteinrohextrakten wurden 50 ml einer dichten *P. tricornutum* Kultur pelletiert (5 min, 1.500 x g), in alkalischem Lysepuffer resuspendiert und 10 min unter mehrmaligem Vortexen auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt und die Proteine mit TCA gefällt (10 % Endkonzentration). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Proteine pelletiert (15 min, 20.000 x g) und mehrmals mit eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Pellets im Vakuum getrocknet, mit 200 µl Harnstoffpuffer versetzt und mit einem Eppi-Potter resuspendiert. Final wurden die Proteinproben 20 min unter Schütteln bei 60 °C inkubiert, zentrifugiert (5 min, 20.000 x g, RT) und der Überstand bei -20 °C gelagert

Harnstoffpuffer

Urea	8 M
Tris/HCl pH 6.8	200 mM
EDTA	0.1 mM
SDS	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0.03 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)

Lysepuffer

NaOH	1.85 M
β-Mercaptoethanol	7.5 % (v/v)

5.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinextrakten wurde kolorimetrisch mit dem Protein bindenden Farbstoff Amidoschwarz nach einem modifizierten Protokoll von Schaffner und Weissmann bestimmt (Schaffner & Weissmann, 1973). 5 µl Proteinextrakt wurden mit 95 µl ddH₂O und 400 µl Amidoschwarz-Lösung gemischt und 15 min zentrifugiert (4 °C, 20.000 x g). Das Pellet wurde mit 500 µl Waschlösung durch erneute Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet, in 1 ml 0.2 M NaOH resuspendiert und die Absorption bei 615 nm bestimmt. Durch Messung der Absorption bei Einsatz definierter BSA Konzentrationen wurde zuvor eine Eichgerade für die Amidoschwarz-Lösung erstellt.

Amidoschwarz-Lösung

Methanol 90 %	90 % (v/v)
Ethanol	10 % (v/v)
Amidoschwarz 10B	0.01 % (w/v)

Waschlösung

Methanol	90 % (v/v)
Ethanol	10 % (v/v)

5.2.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 8.5 – 15 % Gele verwendet. Zur Herstellung der Gelmatrix wurde eine vorgefertigte Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:0.8 (Rothiphorese Gel 30) der Firma Roth eingesetzt. Als Molekulargewichts-Standard diente *PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder* der Firma Fermentas.

5.2.3.4 Semidry Westernblot und Immunodetektion

Um gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine spezifisch mittels Immunodetektion nachzuweisen, wurden die Proteine zunächst auf einer Membran immobilisiert. Der Transfer erfolgte durch die Methode des Semidry Westernblot nach Towbin et al (Towbin et al, 1979). Unter Verwendung des TE 77 Semi-dry Transfer-Systems der Firma GE-Healthcare wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Gelfläche und einer Spannung von 50 V auf eine Nitrocellulose Membran (Macherey-Nagel) transferiert. Der

Transfer dauerte i. d. R. 1 h. Die anschließende Immunodetektion erfolgte nach Standard-Protokollen. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen der Membran wurde 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verwendet. Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte i. d. R. über Nacht, die Inkubation mit sekundären Antikörpern für 1 h HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper wurden mit ECL-Lösung detektiert.

ECL-Lösung*

Luminol in DMSO	5 mM
Coomaric Acid in DMSO	0.8 mM
Tris/HCl pH 8.5	200 mM

* ECL-Lösung ist bei 4 °C eine Woche haltbar. Kurz vor Gebrauch wurde 30 % H₂O₂ im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

5.2.3.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Expression von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit dem pGEX-5x-3 Expressionsvektor (GE-Healthcare) in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Zellen (Stratagene). 300 ml Kultur wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 2.5 h wurden die Zellen geerntet, in 5 ml PBS mit 1 % Tx-100, Protease-Inhibitoren und 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer French Press aufgeschlossen (1000 psi, 5 x) und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (20 min, 9.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde auf 400 µl einer Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben (GE-Healthcare). Die Aufreinigung erfolgte im Weiteren nach Herstellerangaben. Die GST-Fusionsproteine wurden in einem Volumen von 250 µl Elutionspuffer eluiert. Abschließend wurde die Aufreinigung mittels SDS-PAGE mit anschließender Immunodetektion und Coomassie-Färbung überprüft und die Proteinkonzentration ermittelt. Für die Langzeitlagerung wurde das Eluat mit 10 % Glycerin und 1 mM DTT versetzt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.2.3.6 Carbonatextraktion

Die Trennung assoziierter und integraler Membranproteine von *P. tricornutum* erfolgte mittels Carbonatextraktion. 150 ml einer dichten *P. tricornutum* Kultur wurden geerntet

(5 min, 1.500 x g), 1 x in PBS gewaschen und in Solubilisierungspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French Press (1.000 psi, 5 x). Anschließend wurden intakte Zellen abzentrifugiert (5 min, 1.500 x g) und die Membranen aus dem Überstand bei 120.000 x g für 30 min pelletiert. Der resultierende Überstand enthält lösliche Proteine. Das Membranpellet wurde in Carbonatpuffer pH 11.5 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, um assoziierte Proteine von der Membran zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 120.000 x g) wurden integrale Membranproteine im Membranpellet von assoziierten Membranproteinen des Überstandes getrennt. Alle Fraktionen wurden mit 10 % TCA gefällt, in Harnstoffpuffer resuspendiert und zu gleichen Teilen bei der anschließenden SDS-PAGE geladen.

<u>Solubilisierungspuffer*</u>		<u>Carbonatpuffer*</u>	
NaCl	50 mM	NaHCO ₃ pH 11.5	100 mM
Imidazole/HCl pH 7	50 mM		
6-aminohexanoic acid	2 mM		
EDTA	1 mM		
Sucrose	8.5 % (w/v)		

* Beiden Puffern wurde Protease-Inhibitor Cocktail (PIC) 1:200 zugegeben. (200µg/ml Antipain, 200µg/ml, Chymostatin, 200µg/ml Aprotinin, 200µg/ml Trypsin-Inhibitor, 200µg/ml Na₂-EDTA, 200µg/ml Pepstatin A, 200µg/ml Leupeptin, 200µg/ml Elastinal)

5.2.3.7 Co-Immunopräzipitation von Proteinen aus *P. tricornutum*

Für die Immunopräzipitation der Membranproteine sDer1-2 und sDer1-2+GFP sowie ihrer Interaktionspartner wurden 3×10^9 *P. tricornutum* Zellen des sDer1-2+GFP Klons geerntet (5 min, 1.500 x g), mit PBS gewaschen und in 5 ml IP-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer French Press aufgeschlossen (1.000 psi, 5 x) und intakte Zellen abzentrifugiert (5 min, 1.000 x g). Anschließend wurden die Membranen pelletiert (30 min, 120.000 x g, 4 °C) und in 1.5 ml IP-Puffer resuspendiert. Um integrale Membranproteine zu lösen, wurde 2 % Digitonin (Calbiochem) zugegeben und der Proteinextrakt 4 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Im Weiteren wurden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand auf 100 µl einer 50 % Mischung ProteinA Agarose-Matrix (ThermoScientific) gegeben, an welche zuvor Antikörper gegen GFP bzw. sDer1-2 kovalent gebunden wurden (Crosslinking-Protokoll nach Abcam unter Verwendung von 20 µl αGFP-AK bzw. 40 µl α sDer1-2 AK.).

Der Ansatz wurde über Nacht rollend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix zweimal mit IP-Puffer + 0.5 % Digitonin gewaschen und die Proteine final mit 50 µl 1xSDS Puffer 5 min bei 95 °C eluiert. 25 µl des Eluats wurden für SDS-PAGE und Immunodetektion eingesetzt.

IP-Puffer*

Tris/HCl pH 7.5	50 mM
KOAc	200 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)

* Kurz vor Gebrauch wurden dem Puffer 10 mM NEM, 25 mg/ml E64d und PIC zugesetzt.

5.2.4 *In vivo* Lokalisationsstudien in *P. tricornutum*

In vivo Lokalisationsstudien erfolgten in *P. tricornutum* durch die Expression von eGFP-Fusionsproteinen und die anschließende Analyse an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (vgl. Abschnitt 5.2.8.). Die Sequenzen verschiedener Zielsteuerungssequenzen sowie von Proteinen voller Länge wurden 5' der eGFP-Sequenz in den Transfektionsvektor pPha-T1 (Zaslavskaja et al, 2000) kloniert, so dass ein Fusionsprotein mit C-terminalem eGFP-Tag exprimiert wurde. I. d. R. wurde pPhaT1 über *EcoRI/HindIII* geöffnet und die Sequenz von Interesse über die Schnittstellen *EcoRI/BamHI* zusammen mit der *BamHI/HindIII* restringierten eGFP-Sequenz einkloniert.

5.2.5 *In vivo* Analysen zur Topologie von Membranproteinen mittels Self-assembling GFP

Das Self-assembling GFP-System wurde von Cabantous et al. 2005 etabliert und wurde bereits zuvor für *in vivo* Lokalisationsstudien und Analysen zur Topologie von Membranproteinen genutzt (Cabantous et al, 2005; van Dooren et al, 2008). Beim Self-assembling GFP-System wird der C-terminale β -Strang des GFP (GFP-11) vom Rest des Proteins (GFP1-10) abgespalten, so dass beide GFP-Fragmente für sich keine Fluoreszenz zeigen. Die Fragmente haben jedoch eine sehr hohe Affinität und assemblieren stabil, sichtbar durch GFP-Fluoreszenz, sobald sie in räumlicher Nähe sind. Um die Lokalisation und die Topologie der beiden Membranproteine sDer1-1 und sDer1-2 zu untersuchen, wurde das Fragment GFP-11 mit einem Spacer (PGGGGP) an den C-Terminus der volle-

Länge Proteine sowie an C-terminal um eine Transmembrandomäne verkürzte Versionen von sDer1-1 und sDer1-2 fusioniert. Diese verkürzten Varianten wurden mittels PCR generiert, so dass sDer1-1 auf 223 Aminosäuren, sDer1-2 auf 250 Aminosäuren verkürzt wurde. Die verwendeten Oligonukleotide (s_Der1-1 fw *EcoRI* +s_Der1-1-C rv *BglII* bzw. s_Der1-2 fw *EcoRI* + s_Der1-2-C rv *BamHI*) sind Abschnitt 5.1.9 zu entnehmen. Das Fragment GFP1-10 wurde über einen Spacer (PGGGGP) an Markerproteine verschiedener Kompartimente von *P. tricornutum* fusioniert. Die Protein-Identifikationsnummern aller verwendeten Proteine sowie die entsprechenden Zielsteuerungssequenzen sind Teil B des Anhangs zu entnehmen. Als ER-Marker wurde die endogene Protein-Disulfid-Isomerase in voller Länge eingesetzt, während die Zielsteuerungssequenz von sHsp70 genutzt wurde, um GFP1-10 ins PPC zu dirigieren. In einer Negativ-Kontrolle wurde GFP1-10 ins ER dirigiert und GFP-11 mit Hilfe der Zielsteuerungssequenz von AtpC ins Stroma der Plastide gesteuert. Als Positiv-Kontrolle wurde GFP1-10 an die Zielsteuerungssequenz von sHsp70 fusioniert und GFP-11 an das volle-Länge Protein sUbc4. Zur Untersuchung der Lokalisation und Topologie von s-E3 wurde GFP-11 an den C-Terminus des Proteins fusioniert bzw. im N-terminalen Bereich zwischen Aminosäure 163 und 164 inseriert. Beide Konstrukte wurden in Kombination mit den beschriebenen ER- und PPC-Markern exprimiert. Alle beschriebenen Kombinationen an GFP1-10/GFP-11 Fusionskonstrukten wurden in den Transfektionsvektor pPha-DUAL[2xNR] kloniert, einen modifizierten pPha-T1 Vektor mit zwei Klonierungskassetten (MCS I + MCS II), die beide unter Kontrolle des induzierbaren Nitratreduktase-Promotors von *P. tricornutum* stehen (vgl. Vektorkarte Abb. A-6 im Anhang). Dabei wurden Fusionskonstrukte mit GFP1-10 in MCS I kloniert, Fusionskonstrukte mit GFP-11 in MCS II eingebracht. Die Transfektion von *P. tricornutum* erfolgte unter nicht-induzierten Bedingungen mit 1.5 mM Ammonium als einzige Stickstoffquelle im Medium. Transfizierte Klone wurden anschließend mittels Kolonie-PCR auf die Integration beider Fusionskonstrukte getestet. Positive Klone wurden in 50 ml f/2-Medium mit 1.5 mM Ammonium angeimpft. Für die Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen geerntet (5 min, 1.5000 x g), in Stickstoff freiem Medium gewaschen und in frisches Medium mit 0.9 mM Nitrat überführt, um die Expression der Fusionskonstrukte zu induzieren. Nach 6 h Induktion wurden die Klone am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert (vgl. Abschnitt 5.2.9).

5.2.6 *In vivo* Proteininteraktionsstudien mittels Split-GFP

Das Prinzip des Split-GFP Interaktionssystems beruht darauf, dass GFP in zwei Fragmente gespalten wird (N-GFP und C-GFP), die alleine nicht interagieren können und keine Fluoreszenz zeigen. Erst durch die Fusion beider Fragmente an zwei interagierende Proteine werden die GFP-Fragmente nah genug zusammengeführt, um zu assemblieren – visualisiert durch die GFP-Fluoreszenz (Ghosh et al, 2000; Kerppola, 2006). Für die Interaktionsstudien in dieser Arbeit wurden die Proteine von Interesse mit einem Spacer (PGGGGP) jeweils an den N-Terminus der Split-eGFP-Fragmente N-GFP (AS 1-155) bzw. C-GFP (AS 156-245) fusioniert. Die Konstrukte wurden in den Transfektionsvektor pPha-DUAL[2xNR] kloniert (vgl. Abschnitt 5.2.5). Folgende Klonierungsstrategie wurde verfolgt, um verschiedene Protein-Protein-Interaktionen zu testen. Während Fusionskonstrukte des N-GFP Fragments in MCS I eingebracht wurden, wurden C-GFP Fusionskonstrukte in MCS II kloniert. Zur Untersuchung der Hetero-Oligomerisierung der sDer1-Proteine wurde sDer1-1 an N-GFP fusioniert und sDer1-2 an C-GFP. Zur Untersuchung der Homo-Oligomerisierung der sDer1-Proteine wurde das gleiche Protein an beide GFP-Fragmente fusioniert. Für Interaktionstests zwischen Zielsteuerungssequenzen und den sDer1-Proteinen, wurden verschiedene Zielsteuerungssequenzen (BTS von AtpC, FcpD, sHsp70 und sCdc48) an N-GFP fusioniert, während das jeweilige sDer1-Protein in Fusion mit C-GFP exprimiert wurde. Mutationen in den Transitpeptiden von sHsp70 und AtpC wurden mittels PCR eingeführt. Dabei wurde das erste Codon des sHsp70-Transitpeptids von CAT zu TTT mutiert; im Fall von AtpC wurde das erste Codon des Transitpeptids von TTC zu GCC geändert. Die dabei verwendeten Oligonukleotide (AtpC fw -F *SpeI* + AtpC rv BTS *Bam*HI bzw. Hsp70 fw + F *SpeI* + Hsp70 BTS rv *Bam*HI) sind Abschnitt 5.1.9 zu entnehmen. Als Negativ-Kontrolle wurde die BTS von sDer1-2 an N-GFP und die BTS von sDer1-1 an C-GFP fusioniert und damit beide Fragmente ins PPC dirigiert. Weitere Kontrollen wurden mit den bZIP-Domänen der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun von *Rattus norvegicus* in *P. tricornutum* durchgeführt. Die Sequenzen für bJun, bFos und bFosΔ sind Hu et al. 2003 zu entnehmen (Hu & Kerppola, 2003). Die Transfektion von *P. tricornutum* erfolgte unter nicht-induzierten Bedingungen (vgl. Abschnitt 5.2.5). Transfizierte Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf die Integration der Konstrukte überprüft. Positive Klone wurden auf f/2

Platten mit 0.9 mM Nitrat überimpft und nach 3 Tagen am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert (vgl. Abschnitt 5.2.9).

5.2.7 *In vitro* Ubiquitinierungs-Analysen

Die Ubiquitinligase-Aktivität des Proteins s-E3 und der C-terminalen RING-Domäne des Proteins im Speziellen wurden mit Hilfe des *Ubiquitinylation Kit* der Firma EnzoLifeSciences nach Herstellerangaben getestet. Zuvor wurden sowohl das volle-Länge Protein s-E3 als auch nur der C-terminale Bereich (AS 241-537) mit der RING-Domäne als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST-Tag in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und aufgereinigt (vgl. Abschnitt 5.2.3.5). Für die Negativ-Kontrolle wurde GST ohne Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Ein Standard-Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 µl und bestand aus folgenden Komponenten: 4 µg aufgereinigtes GST-Fusionsprotein (E3), 1 x Ubiquitinierungspuffer, 1 U Anorganische Pyrophosphatase, 1 mM DTT, 5 mM Mg-ATP, 100 nM E1-Enzym, 2.5 µM E2-Enzym (UbcH5b) und 5 µM biotinyliertes Ubiquitin. Die Reaktion wurde 1.5 h bei 37 °C inkubiert und mit 50 µl 2x *Non-reducing gel loading buffer* gestoppt. Anschließend wurden 25 µl der Reaktion über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Ubiquitin-Konjugate wurden unter Verwendung von HRP-Streptavidin (ThermoScientific) detektiert.

5.2.8 *In silico* Analysen von Zielsteuerungssequenzen

Proteinsequenzen wurden zunächst mit dem Programm *BlastP* auf konservierte Domänen und Homologien zu Proteinen anderer Organismen untersucht. Proteine mit N-terminalen Extensionen über den konservierten Domänenbereich hinaus wurden im Weiteren mit den Programmen SignalP (Bendtsen et al, 2004) und TargetP (Emanuelsson et al, 2000) auf putative Zielsteuerungssequenzen hin analysiert. Bei einem vorhergesagten Signalpeptid wurde die darauf folgende Sequenz in TargetP erneut auf ein Transitpeptid bzw. eine mitochondrielle Präsequenz untersucht, um potentielle zweigeteilte Zielsteuerungssequenzen (BTS) zu identifizieren. Die Zielsteuerungssequenz eines Proteins wurde dann als potentielle BTS eingestuft, wenn das Protein eine N-terminale Extension aufwies, die länger als das vorhergesagte Signalpeptid war – unabhängig davon,

ob dieser Bereich als Transitpeptid oder mitochondrielle Präsequenz in TargetP angegeben wurde.

5.2.9 Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie

Die Analyse aller in dieser Arbeit angewendeten *in vivo* GFP-Systeme erfolgte am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP2 der Firma Leica unter Verwendung des Objektivs PL APO 63 x 1.32-0.60 PH3 CS Oil. GFP und Chlorophyll wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. GFP-Fluoreszenz wurde in einem Bereich von 500-520 nm detektiert, Chlorophyll-Fluoreszenz wurde in einem Detektionsfenster von 625-720 nm aufgenommen. Die Daten wurden mit Hilfe der Software LCS Lite von Leica analysiert.

Für immuno-elektronenmikroskopische Analysen wurden *P. tricornutum* Zellen durch Zentrifugation geerntet (10 min, 1.000 x g) und für 4 h mit 0.02 % Glutaraldehyd und 4 % Paraformaldehyd in f/2-Medium fixiert. Die Zellen wurden anschließend in Sorensen's Puffer gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in *Lowicryl K4M* Harz nach Herstellerangaben eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Ultracut, Reicher-Jung) angefertigt. *In situ* Lokalisationsanalysen der Proteine sDer1-1, sDer1-2 und s-E3 erfolgten durch Inkubation der Dünnschnitte mit spezifischen primären Antikörpern (vgl. Abschnitt 5.1.11). Der verwendete sekundäre Antikörper ist an 30 nm Goldpartikel gekoppelt (α rabbit, Biocell). Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat unter Standard-Bedingungen nachkontrastiert.

Literaturverzeichnis

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**(5): 399-451
- Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B (2009) Genetic evidence that an endosymbiont-derived ERAD system functions in import of apicoplast proteins. *J Biol Chem*
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* **252**(5): 572-579
- Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman AR, Kroth PG (2002) In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci* **115**(Pt 21): 4061-4069
- Archibald JM (2008) Plastid evolution: remnant algal genes in ciliates. *Curr Biol* **18**(15): R663-R665
- Archibald JM (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* **19**(2): R81-88
- Bays NW, Gardner RG, Seelig LP, Joazeiro CA, Hampton RY (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* **3**(1): 24-29
- Bays NW, Hampton RY (2002) Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol* **12**(10): R366-371
- Bedard J, Jarvis P (2005) Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot* **56**(419): 2287-2320
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**(4): 783-795
- Bernardi KM, Forster ML, Lencer WI, Tsai B (2008) Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin. *Mol Biol Cell* **19**(3): 877-884
- Bhamidipati A, Denic V, Quan EM, Weissman JS (2005) Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* **19**(6): 741-751
- Bhaya D, Grossman A (1991) Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol Gen Genet* **229**(3): 400-404
- Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**(5344): 1806-1809
- Bodyl A (2004) Evolutionary origin of a preprotein translocase in the periplastid membrane of complex plastids: a hypothesis. *Plant Biol (Stuttg)* **6**(5): 513-518
- Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG (2009) Protein targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol* **56**(1): 9-15
- Bölter B, Soll J, Schulz A, Hinnah S, Wagner R (1998) Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15831-15836

- Bordallo J, Plemper RK, Finger A, Wolf DH (1998) Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* **9**(1): 209-222
- Bouck GB (1965) Fine structure and organelle association in brown algae. *J Cell Biol* **26**(2): 523-537
- Bullmann L, Haar R, Mirus O, Bredemeier R, Hempel F, Maier U, Schleiff E (2009) Filling the gap: the evolutionary conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem*, submitted
- Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Pawlowski J (2008) Phylogenomics reveals a new 'megagroup' including most photosynthetic eukaryotes. *Biol Lett* **4**(4): 366-369
- Buschhorn BA, Kostova Z, Medicherla B, Wolf DH (2004) A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett* **577**(3): 422-426
- Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS (2005) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **23**(1): 102-107
- Camirand A, Heysen A, Grondin B, Herscovics A (1991) Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the gene encoding a specific processing alpha-mannosidase. *J Biol Chem* **266**(23): 15120-15127
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**(2): 361-373
- Cavalier-Smith T (1999) Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* **46**(4): 347-366
- Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* **5**(4): 174-182
- Cavalier-Smith T (2002) Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol* **12**(2): R62-64
- Cavalier-Smith T (2003) Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429): 109-133; discussion 133-104
- Chaal BK, Green BR (2005) Protein import pathways in 'complex' chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor. *Plant Mol Biol* **57**(3): 333-342
- Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T, Aeby M (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **184**(1): 159-172
- Crawshaw SG, Cross BC, Wilson CM, High S (2007) The oligomeric state of Derlin-1 is modulated by endoplasmic reticulum stress. *Mol Membr Biol* **24**(2): 113-120
- de Virgilio M, Weninger H, Ivessa NE (1998) Ubiquitination is required for the retro-translocation of a short-lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **273**(16): 9734-9743
- Deak PM, Wolf DH (2001) Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem* **276**(14): 10663-10669
- Denic V, Quan EM, Weissman JS (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**(2): 349-359

- DeRocher A, Gilbert B, Feagin JE, Parsons M (2005) Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. *J Cell Sci* **118**(Pt 3): 565-574
- Deschamps P, Haferkamp I, Dauvillee D, Haebel S, Steup M, Buleon A, Putaux JL, Colleoni C, d'Hulst C, Plancke C, Gould S, Maier U, Neuhaus HE, Ball S (2006) Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot Cell* **5**(6): 954-963
- Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**(5785): 314-318
- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG (2001) The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**(6832): 1091-1096
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15
- Driessen AJ, Nouwen N (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **77**: 643-667
- Durnford DG, Gray MW (2006) Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryot Cell* **5**(12): 2079-2091
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**(4): 1005-1016
- Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ (2001) Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* **18**(3): 418-426
- Felsner G, Sommer M, Gruenheit N, Hempel F, Moog D, Zauner S, Martin W, Maier U (2009) ERAD components in chromists suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane in secondary symbioses involving different hosts. *Eukaryot Cell*, submitted
- Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI (2003) Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **299**(5607): 705-708
- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**(7): 379-384
- Gabaldon T, Snel B, van Zimmeren F, Hemrika W, Tabak H, Huynen MA (2006) Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol Direct* **1**: 8
- Gardner RG, Swarbrick GM, Bays NW, Cronin SR, Wilhovsky S, Seelig L, Kim C, Hampton RY (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* **151**(1): 69-82
- Garza RM, Sato BK, Hampton RY (2009) In vitro analysis of Hrd1p-mediated retrotranslocation of its multispinning membrane substrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase. *J Biol Chem* **284**(22): 14710-14722
- Gauss R, Sommer T, Jarosch E (2006) The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *EMBO J* **25**(9): 1827-1835
- Ghosh I, Hamilton AD, Regan L (2000) Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 122, pp. 5658-5659.

- Gibbs SP (1979) The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. *J Cell Sci* **35**: 253-266
- Gilson PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ, McFadden GI (2006) Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(25): 9566-9571
- Goder V, Carvalho P, Rapoport TA (2008) The ER-associated degradation component Der1p and its homolog Dfm1p are contained in complexes with distinct cofactors of the ATPase Cdc48p. *FEBS Lett* **582**(11): 1575-1580
- Gould SB (2006) Housing an enslaved alga and how to get there. Dissertation. Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Gould SB, Fan E, Hempel F, Maier UG, Klosgen RB (2007) Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *J Biol Chem* **282**(41): 30295-30302
- Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG (2006a) Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol* **62**(6): 674-681
- Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG (2006b) Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol* **23**(12): 2413-2422
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 491-517
- Greenwood AD, Griffiths HB, Santore UJ (1977) Chloroplasts and cell compartments in cryptophyceae. *Brit Phycol* **12**: 119
- Gruber A, Vugrinec S, Hempel F, Gould SB, Maier UG, Kroth PG (2007) Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Mol Biol* **64**(5): 519-530
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* **163**(3): 333-347
- Hackett JD, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D (2004) Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am J Bot* **9**: 1523-1534
- Hackett JD, Yoon HS, Li S, Reyes-Prieto A, Rummele SE, Bhattacharya D (2007) Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Mol Biol Evol* **24**(8): 1702-1713
- Hagopian JC, Reis M, Kitajima JP, Bhattacharya D, de Oliveira MC (2004) Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. liui provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *J Mol Evol* **59**(4): 464-477
- Harper JT, Keeling PJ (2003) Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol Biol Evol* **20**(10): 1730-1735
- Harper JT, Waanders E, Keeling PJ (2005) On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 1): 487-496
- Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Gorlich D, Jentsch S, Rapoport TA (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**(6464): 654-657

- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049
- Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol* **7**: 193-200
- Hempel F, Bozarth A, Sommer MS, Zauner S, Przyborski JM, Maier UG (2007) Transport of nuclear-encoded proteins into secondarily evolved plastids. *Biol Chem* **388**(9): 899-906
- Hempel F, Bullmann L, Lau J, Zauner S, Maier UG (2009) ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Biol Evol* **26**(8): 1781-1790
- Hibberd DJ, Norris RE (1984) Cytology and ultrastructure of Chlorarachnion reptans (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J Phycol* **20**: 310-330
- Hirakawa Y, Nagamune K, Ishida K (2009) Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 12820-12825
- Hirsch C, Blom D, Ploegh HL (2003) A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J* **22**(5): 1036-1046
- Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**(7237): 453-460
- Hitt R, Wolf DH (2004) Der1p, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res* **4**(7): 721-729
- Hjorth E, Hadfi K, Gould SB, Kawach O, Sommer MS, Zauner S, Maier UG (2004) Zero, one, two, three, and perhaps four - Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Res* **15**: 459-468
- Hu CD, Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**(5): 539-545
- Inagaki J, Fujita Y, Hase T, Yamamoto Y (2000) Protein translocation within chloroplast is similar in Euglena and higher plants. *Biochem Biophys Res Commun* **277**(2): 436-442
- Ishida K, Green BR (2002) Second- and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9294-9299
- Ismail N, Ng DT (2006) Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble! *Cell* **126**(2): 237-239
- Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* **4**(2): 134-139
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**(10): 403-405
- Joazeiro CA, Weissman AM (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**(5): 549-552
- Kalanon M, McFadden GI (2008) The chloroplast protein translocation complexes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a bioinformatic comparison of Toc and Tic components in plants, green algae and red algae. *Genetics* **179**(1): 95-112
- Kalanon M, Tonkin CJ, McFadden GI (2009) Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **8**(8): 1146-1154

- Keeling PJ (2009) Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol* **56**(1): 1-8
- Kerppola TK (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 449-456
- Kikkert M, Doolman R, Dai M, Avner R, Hassink G, van Voorden S, Thanedar S, Roitelman J, Chau V, Wiertz E (2004) Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**(5): 3525-3534
- Kilian O, Kroth PG (2005) Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* **41**(2): 175-183
- Kim I, Ahn J, Liu C, Tanabe K, Apodaca J, Suzuki T, Rao H (2006) The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J Cell Biol* **172**(2): 211-219
- Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* **15**(4): 753-763
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**(5): 635-644
- Kostova Z, Tsai YC, Weissman AM (2007) Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Semin Cell Dev Biol* **18**(6): 770-779
- Kostova Z, Wolf DH (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* **22**(10): 2309-2317
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685
- Lane CE, van den Heuvel K, Kozera C, Curtis BA, Parsons BJ, Bowman S, Archibald JM (2007) Nucleomorph genome of *Hemiselmis andersenii* reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19908-19913
- Lang M, Apt KE, Kroth PG (1998) Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. *J Biol Chem* **273**(47): 30973-30978
- Latterich M, Frohlich KU, Schekman R (1995) Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* **82**(6): 885-893
- Lilley BN, Ploegh HL (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**(6994): 834-840
- Lilley BN, Ploegh HL (2005) Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14296-14301
- Lim L, Kalanon M, McFadden GI (2009) New proteins in the apicoplast membranes: time to rethink apicoplast protein targeting. *Trends Parasitol* **25**(5): 197-200
- Margulis L (1970) Origin of eukaryotic cells. *New Haven, Yale University Press* **349**
- Martin W (2003) Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8612-8614
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12246-12251

- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**(6681): 162-165
- McFadden GI (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J Phycol* **37**: 951-959
- McFadden GI, van Dooren GG (2004) Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol* **14**(13): R514-516
- McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A (1991) UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J* **10**(1): 227-236
- Medicherla B, Kostova Z, Schaefer A, Wolf DH (2004) A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* **5**(7): 692-697
- Melkonian M (1996) Phylogeny of photosynthetic protists and their plastid. *Verh Dtsch Ges Zoo* **89**: 71-96
- Mereschkowsky C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl* **25**: 593-604
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**(8): 766-772
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G (2000) A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* **19**(10): 2181-2192
- Meyer HH, Wang Y, Warren G (2002) Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J* **21**(21): 5645-5652
- Molinari M (2007) N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* **3**(6): 313-320
- Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**(5935): 1724-1726
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**(5809): 201-205
- Nakatsukasa K, Brodsky JL (2008) The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **9**(6): 861-870
- Nassoury N, Cappadocia M, Morse D (2003) Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci* **116**(Pt 14): 2867-2874
- Neuber O, Jarosch E, Volkwein C, Walter J, Sommer T (2005) Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**(10): 993-998
- Nicholas KB, Nicholas jr. HB, Deerfield DWI (1997) GenDoc: Analyses and visualization of genetic variation. *Embnew News* **4**: 14
- Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K (2006) Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **172**(3): 383-393
- Okamoto N, Chantangsi C, Horak A, Leander BS, Keeling PJ (2009) Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS One* **4**(9): e7080

- Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 529-550
- Patron NJ, Inagaki Y, Keeling PJ (2007) Multiple gene phylogenies support the monophyly of cryptomonad and haptophyte host lineages. *Curr Biol* **17**(10): 887-891
- Patron NJ, Rogers MB, Keeling PJ (2004) Gene replacement of fructose-1,6-bisphosphate aldolase supports the hypothesis of a single photosynthetic ancestor of chromalveolates. *Eukaryot Cell* **3**(5): 1169-1175
- Patron NJ, Waller RF (2007) Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays* **29**(10): 1048-1058
- Patron NJ, Waller RF, Archibald JM, Keeling PJ (2005) Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *J Mol Biol* **348**(4): 1015-1024
- Patron NJ, Waller RF, Keeling PJ (2006) A tertiary plastid uses genes from two endosymbionts. *J Mol Biol* **357**(5): 1373-1382
- Plempner RK, Bordallo J, Deak PM, Taxis C, Hitt R, Wolf DH (1999) Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* **112** (Pt 22): 4123-4134
- Pohlschroder M, Hartmann E, Hand NJ, Dilks K, Haddad A (2005) Diversity and evolution of protein translocation. *Annu Rev Microbiol* **59**: 91-111
- Radhamony RN, Theg SM (2006) Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol* **16**(8): 385-387
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**(7170): 663-669
- Reumann S, Davila-Aponte J, Keegstra K (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 784-789
- Reumann S, Keegstra K (1999) The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends Plant Sci* **4**(8): 302-307
- Reyes-Prieto A, Moustafa A, Bhattacharya D (2008) Multiple genes of apparent algal origin suggest ciliates may once have been photosynthetic. *Curr Biol* **18**(13): 956-962
- Rice DW, Palmer JD (2006) An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol* **4**: 31
- Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoegge C, Jentsch S (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**(1): 73-84
- Richter S, Lamppa GK (2002) Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **277**(46): 43888-43894
- Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe H, Lang BF (2005) Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* **15**(14): 1325-1330
- Rogers MB, Archibald JM, Field MA, Li C, Striepen B, Keeling PJ (2004) Plastid-targeting peptides from the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*. *J Eukaryot Microbiol* **51**(5): 529-535

- Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ (2007) The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol* **24**(1): 54-62
- Rouiller I, Butel VM, Latterich M, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM (2000) A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol Cell* **6**(6): 1485-1490
- Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM (2002) Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat Struct Biol* **9**(12): 950-957
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning - Laboratory Manuals. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- Sanchez-Puerta MV, Delwiche CF (2008) A hypothesis for plastid evolution in chromalveolates. *J Phycol* **44**(5): 1097-1107
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467
- Sato BK, Hampton RY (2006) Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* **23**(14-15): 1053-1064
- Sato BK, Schulz D, Do PH, Hampton RY (2009) Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. *Mol Cell* **34**(2): 212-222
- Schafer A, Wolf DH (2009) Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO J* **28**(19): 2874-2884
- Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* **56**(2): 502-514
- Schopf JW (1993) Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646
- Schuberth C, Buchberger A (2005) Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**(10): 999-1006
- Shamu CE, Flierman D, Ploegh HL, Rapoport TA, Chau V (2001) Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell* **12**(8): 2546-2555
- Slavikova S, Vacula R, Fang Z, Ehara T, Osafune T, Schwartzbach SD (2005) Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*. *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1651-1661
- Soll J, Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3): 198-208
- Sommer MS (2007) Ein ERAD-abgeleiteter Präproteintranslokator in der periplastidären Membran der Chromalveolaten? Dissertation. Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG (2007) Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol* **24**(4): 918-928

- Spork S, Hiss JA, Mandel K, Sommer M, Kooij TW, Chu T, Schneider G, Maier UG, Przyborski JM (2009) An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **8**(8): 1134-1145
- Steiner JM, Löffelhardt W (2002) Protein import into cyanelles. *Trends Plant Sci* **7**(2): 72-77
- Steiner JM, Yusa F, Pompe JA, Löffelhardt W (2005) Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles. *Plant J* **44**(4): 646-652
- Stoebe B, Maier UG (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* **219**(3-4): 123-130
- Sulli C, Fang Z, Muchhal U, Schwartzbach SD (1999) Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *J Biol Chem* **274**(1): 457-463
- Suzuki T, Park H, Hollingsworth NM, Sternglanz R, Lennarz WJ (2000) PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase. *J Cell Biol* **149**(5): 1039-1052
- Swanson R, Locher M, Hochstrasser M (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* **15**(20): 2660-2674
- Takahashi F, Okabe Y, Nakada T, Sekimoto H, Ito M, Kataoka H, Nozaki H (2007) Origins of the secondary plastids of Euglenophyta and Chlorarachniophyta as revealed by an analysis of the plastid-targeting, nuclear-encoded gene psbO. *J Phycol* **43**: 1302-1309
- Tartakoff AM, Tao T (2009) Comparative and evolutionary aspects of macromolecular translocation across membranes. *Int J Biochem Cell Biol*
- Taxis C, Hitt R, Park SH, Deak PM, Kostova Z, Wolf DH (2003) Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* **278**(38): 35903-35913
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**(2): 123-135
- Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI (2006a) N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **150**(2): 192-200
- Tonkin CJ, Struck NS, Mullin KA, Stimmer LM, McFadden GI (2006b) Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol* **61**(3): 614-630
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354
- Tremblay LO, Herscovics A (1999) Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology* **9**(10): 1073-1078
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(4): 246-255
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW,

- Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL (2006) Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**(5791): 1261-1266
- van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, Humbel BM, Striepen B (2008) Toxoplasma gondii Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13574-13579
- Vashist S, Ng DT (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**(1): 41-52
- Villarejo A, Buren S, Larsson S, Dejardin A, Monne M, Rudhe C, Karlsson J, Jansson S, Lerouge P, Rolland N, von Heijne G, Grebe M, Bako L, Samuelsson G (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**(12): 1224-1231
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068
- Wahlman J, DeMartino GN, Skach WR, Bulleid NJ, Brodsky JL, Johnson AE (2007) Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* **129**(5): 943-955
- Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12352-12357
- Waller RF, McFadden GI (2005) The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol* **7**(1): 57-79
- Wastl J, Maier UG (2000) Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem* **275**(30): 23194-23198
- Wiertz EJ, Tortorella D, Bogoy M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**(6608): 432-438
- Willer M, Forte GM, Stirling CJ (2008) Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *J Biol Chem* **283**(49): 33883-33888
- Wunder T, Martin R, Löffelhardt W, Schleiff E, Steiner JM (2007) The invariant phenylalanine of precursor proteins discloses the importance of Omp85 for protein translocation into cyanelles. *BMC Evol Biol* **7**: 236
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**(6864): 652-656
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2003) Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* **162**(1): 71-84
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**(6994): 841-847
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**(5): 809-818

- Yoon HS, Hackett JD, Pinto G, Bhattacharya D (2002) The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15507-15512
- Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE (2000) Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol* **36**: 379-386
- Zhang JX, Braakman I, Matlack KE, Helenius A (1997) Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell* **8**(10): 1943-1954
- Zhang X, Shaw A, Bates PA, Newman RH, Gowen B, Orlova E, Gorman MA, Kondo H, Dokurno P, Lally J, Leonard G, Meyer H, van Heel M, Freemont PS (2000) Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* **6**(6): 1473-1484

Anhang

A Alignments

Der1p	:	-----	:	-
h_Der1-1	:	-----	:	-
h_Der1-2	:	-----	:	-
s_Der1-1	:	-----MKSSTLVSMLLLVSALS VGYVRS	:	24
S_Der1-2	:	-----MSTFYSLPYACVVLLCLVTACAATFPGGRALFGCSFPRSRRLPVGT	:	48
Der1p	:	-----	:	-
h_Der1-1	:	-----MDFG	:	4
h_Der1-2	:	-----	:	-
s_Der1-1	:	AWRHVAPTITTHVFQSGGEDFLELRGGASKRRSNKAKSASLNSKSRATGKK	:	77
S_Der1-2	:	LSASLADQKPCLAALSVLTDTRGGAAVFEDSDSEDEDEDEDFLFGMDADDF	:	101
Der1p	:	-----MDAVILNLLGDIPLVTRLWTIGCLVLSGLTSLRIVD--PGKV	:	41
h_Der1-1	:	AQALGAGGHAGAGVDLMSWYMEIPVSRRLYLTAFLTSAACAEIIS--PFSL	:	55
h_Der1-2	:	MPFAQPVQGVADAAGPDQWFKSLFVVTRYWFGATIAVTLAANFEIIS--SGQC	:	51
s_Der1-1	:	KVGATAAEKKSALSDTMQRYKRRLPLTRIYITMVGVA TLISITFGEEFTQSLI	:	130
s_Der1-2	:	DMAESEFAEDNTVDRLMIDAWRKTPPLTKGYLSASFAATLYGYLFNRNEFPTVL	:	154
Der1p	:	VYSYDLVFKKGQYGRLLYSIFDYGA FNWISMINIFVSANHLSTLENSFN----	:	90
h_Der1-1	:	YFNVDLVVQG-QIWRVITSYLFFGVFSVDFLFHMYFVRYSRLLLEDG-----D	:	102
h_Der1-2	:	AFVPLVRYKFELWRLLSCFLYAGPFSMNTMISCMIVTFSRQYEAGGPYNTG	:	104
s_Der1-1	:	ALDPTRAFYGFEEWRPFTAASFLGPISIGWLMSCGYLF EYGSLERAY-----	:	178
s_Der1-2	:	LLDKPVLQKLQIWRLLTSFLNFGPLGLGYLMTAHFWTYMATLERLN-----	:	202
Der1p	:	---LRRKFCWITFL-----LLVILVKMTSIEQPAASLGVLLENLVYELKKN	:	135
h_Der1-1	:	FRGRTANYVMFLFG----IFQISIVASYMNV--EFLGSALTFFMAYVWGRRN	:	149
h_Der1-2	:	AGGGTADFAFMLMFGAAIMLITFPLVTAILGLP-PIFCQNMISYVLYTWSRRN	:	156
s_Der1-1	:	---GTAQHVFVFLMSQ----VFGLTFLSSLTGQP--FFGQSMITAMLHVLSRAM	:	222
s_Der1-2	:	HD-RPYDEWIMLFFG----QLSMVVGYPFKLSPRFLGHNLSTFLVYIWSRYH	:	250
Der1p	:	GNQMNVRFFGAIDVSPSIFPIYMNVMYFVYK--RSWLEIAMNFM PGHVIYYM	:	186
h_Der1-1	:	-EDVKMSFLGFLTFHAPYLPWVMTFSVLIG---NSPLMDIIGICVGHSYFFL	:	198
h_Der1-2	:	-PTAQANIWG-MPVPGNYLPFAHLALTVMFG---NPYADQLHGLMCGHIIYYFL	:	204
s_Der1-1	:	-PHQVKWLI-FTVPYWSLPYGLMASDVLQAQSAMAALPHILGIVSGHEVHFH	:	273
s_Der1-2	:	-EGMEVNMFE LFNTRAEMLPWFFLAQTFLLEG--ELPVLDFLGIVFGHIIYHHC	:	300
Der1p	:	DDIIGKIIYGID-----LCKSPYDWRNTETPAHW	:	215
h_Der1-1	:	EFVYPVIA DIRGWQVKR-----ILEFPAILRWLCGNPGDAER	:	235
h_Der1-2	:	VDVVPQVQKDI LHTPRFLIDAFGIGEYRPTVEAVAEPQGGGARIAGLGNAAP	:	257
s_Der1-1	:	KFIWPKKGGED-WL-----VAEDFLVRRLDPD SKDAAR	:	305
s_Der1-2	:	KTVG--I-----L--R-----AEDVVVEWYNGDSSLARR	:	325
Der1p	:	R-----	:	216
h_Der1-1	:	AH-----WR-----	:	239
h_Der1-2	:	AQNTAAVGGGGYT WGGGGRPLGRD-----	:	281
s_Der1-1	:	ESVSKALKG---RKKNKGHKLGG-----	:	325
s_Der1-2	:	IR--S-----EYKPISSDFEM-----	:	339

Abb. A-1: Alignment der Aminosäuresequenzen von Der1p aus *S. cerevisiae* und wirts- sowie symbiontenspezifischen Der1-Proteinen aus *P. tricornutum*. Die symbiontenspezifischen Der1-Proteine sDer1-1 und sDer1-2 tragen am N-Terminus eine zweigeteilte Zielsteuerungssequenz für das periplastidäre Kompartiment. Das Signalpeptid ist in blau, das Transitpeptid in rot dargestellt.

```

Pt_s-E3 : MCGTNRWSVLMVAAALGFPPTARATITLVDTKQKFASTQDRNLGKSLWKNNEYMARLQYV : 60
Tp_s-E3 : MTKSTSLLLPLLLLLQTPSNVNATITLSTTGRQYHS-RPASFGMFLQYGLQYVALQYV : 59

Pt_s-E3 : DGNLPLC----- : 67
Tp_s-E3 : EDDLHLCHGEKESYFYFNAGGGAEEEEERGDWILGKDGHKGVESNRSMLQYQSQPEQQSL : 119

Pt_s-E3 : --PSSPSASTHPKYNL-TVPSDDSPVAVLVRGGGCTLEDKVHFAHLHNLEPAGLVKFLIVD : 124
Tp_s-E3 : QHPTNNTTTTPSSGEIHIIPSNGVVPALLAKRGCHCTYETKARIASTVTSPhGTVRFVIVY : 179

Pt_s-E3 : GDHTLSTESTSLLTDSL SAHQDALEIKRSPDQFDTKQDNNDIPLYILHVSYHTEYDLDDIT : 184
Tp_s-E3 : NDD--PEDGNSLITMMPSGGGKA-----GGHEL-WK---DVGL--VFVSYESGVDLHEYIT : 226

Pt_s-E3 : LHCSSRSQSLGGPRIVMDS--RLGTGFLSGPAVWIGLLSLLSACACSCLLVHGGSQWMP : 242
Tp_s-E3 : TSQPSYIHREGGPRILIDGEDRWFPSTY-SEPAA-GLAMLLMLFGVCVCSLSLFLSTALGR : 284

Pt_s-E3 : DPDD-----QEHV : 250
Tp_s-E3 : NGSDGSDAVNEHNLFLLGPDGRARNANERGGAGNGRSRRRGLRLLTMDEVETLPTMEYSS : 344

Pt_s-E3 : PQR-PTRRRLTKNOVKAMLPVYQFDGETIKPA---HGRSTPALVCPDG--LETEILLP-- : 302
Tp_s-E3 : PESSPPRSSLELRD-KSDMP-FEDDEEDAGSGCGDHGADNDGLDSERGGGLCESLITSCK : 402

Pt_s-E3 : -DPATLECCSICIDDDYESGDRRLMLPCHHLFHSKCTGRWLSERSSTCPCLCKDLDFQEDD : 360
Tp_s-E3 : KDFDFDHS CSICLDDYELGEQLRVLPCHHTFHFNCTAPWLTSEPTCPCLCKA-MFEAVRY : 461

Pt_s-E3 : EETDE----EQPVQEPRL--SNPLTSTDGVSVWRSVFGLAELOTOPT-H----- : 403
Tp_s-E3 : EEEAAEGGDGVEDDAQDDNENASREVGDEQSVRTEQSEVLLTPLEEPSIHRRRRRADGP : 521

Pt_s-E3 : -----TQSLFATNDNHGAPVVEVSRPPSTSTQSW-WR-RL--LPSRSAPVEPSTEER : 451
Tp_s-E3 : LGRASRRTRRNERNLDERTAEEADEASPPLMEEPALGWRGRLRGLFGTASTETANNPTNA : 581

Pt_s-E3 : LIEPLLPAEDEEAPAPSTSSGTPETHVATADTARHEQVVSSEDGSEDGASTGELEQSEDLR : 511
Tp_s-E3 : LEEPLLP-NDEGSVV*----- : 595

Pt_s-E3 : SAETTGSNLVNLPSISPDPPSRQESV*----- : 537
Tp_s-E3 : ----- : -

```

Abb. A-2: Alignment der Aminosäuresequenzen der symbiontenspezifischen Ubiquitin-Ligase s-E3 aus *P. tricornutum* (Pt_s-E3) und dem s-E3-Homolog aus *T. pseudonana* (Tp_s-E3). Die konservierten Cysteine und Histidine der RING-H2-Domäne sind mit Sternen markiert.

B Proteinidentifikationsnummern und Zielsteuerungssequenzen

Identifikationsnummer der in dieser Arbeit untersuchten Proteine aus *P. tricornutum*.

	Protein	ID PhatrDB v2.0
	AtpC	50958
	FcpD	18040
	PDI	44937
	hDer1-2	37614
	sCdc48	50978
	sDer1-1	31697
	sDer1-2	35965
	s-E3	48034
	sHsp70	55890
	sUbc4	34112

Protein	Zielsteuerungssequenz (Signalpeptid + Transitpeptid)
AtpC	MRSFCIAALFAVASA FTTQPTSFTVKTANVGERASGVFPEQSSAHRTRKATIVMDG
FcpD	MKTAVIASLIAGAAA FAPAKNAARTSVATT
sCdc48	MVFSRPCLLVAVLSLARSAGA VWAPRSIPSLTTSWAATALRRDLTTAAWGVSESLTASSILRGGSTAAAADDEDVRKSKKSSSKKKKKKKSKKDQ
sDer1-1	MKSSTLVSMILLVSALSVGYVRS DAWRHVAPTITTHVFQQSGGEDFLELRGGASKRRSNKAKSASLNSKS RTATGKKKVGATAAEKKSALSDT
sDer1-2	MSTFYSLPYACVVLLCLVTACA ATPGGRALFGCSFPRSRSLPVGTLSASLADQKPCAALSVLTDTR GGAAAVFEDSDSEEDDEDEDFLFGMDADDFFD
sHsp70	MVHLPSSTLLACVSVLLSGAHPAKA SWLARRTVEKPTLARIHEQRDSTDNRKSRAPFLHRRQYHYAHHPHGLLTTLRGGASNADNK

Abb. A-3: Zielsteuerungssequenzen verschiedener in dieser Arbeit untersuchten Proteine aus *P. tricornutum*. Das Signalpeptid der zweigeteilten Zielsteuerungssequenz ist in blau, das Transitpeptid in rot dargestellt.

C Kontrollexperimente zum Split- und Self-assembling GFP-System

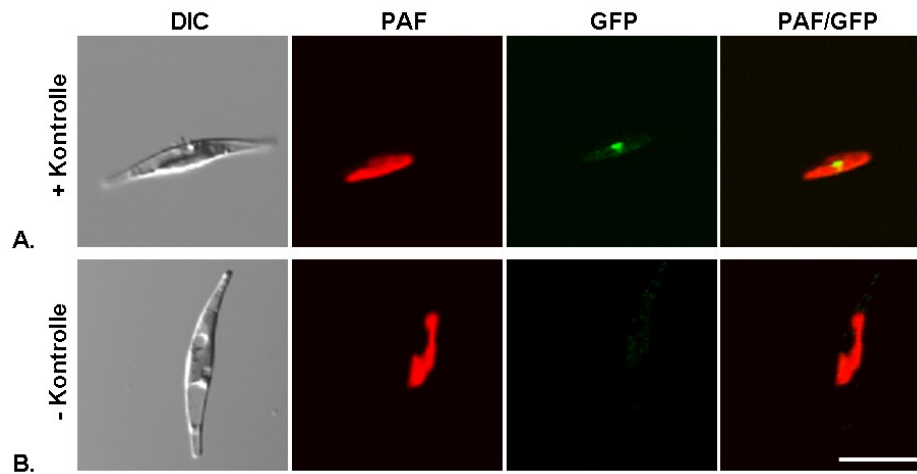


Abb. A-4: Kontrollexperimente zum Self-assembling GFP-System in *P. tricornutum*. **A.** In der Positiv-Kontrolle wurden beide GFP-Fragmente in das periplastidäre Kompartiment dirigiert, wo sie assemblieren. Das PPC wird durch die charakteristische „Blob“-artige GFP-Fluoreszenz markiert. **B.** In der Negativ-Kontrolle wurden GFP1-10 und GFP-11 in verschiedene Kompartimente (Stroma und ER) dirigiert. Wie erwartet findet keine Assemblierung der Fragmente statt und es ist keine GFP-Fluoreszenz zu beobachten. Skala = 10 μ m. PAF - Plastidenautofluoreszenz (Abbildung aus Hempel et al, 2009).

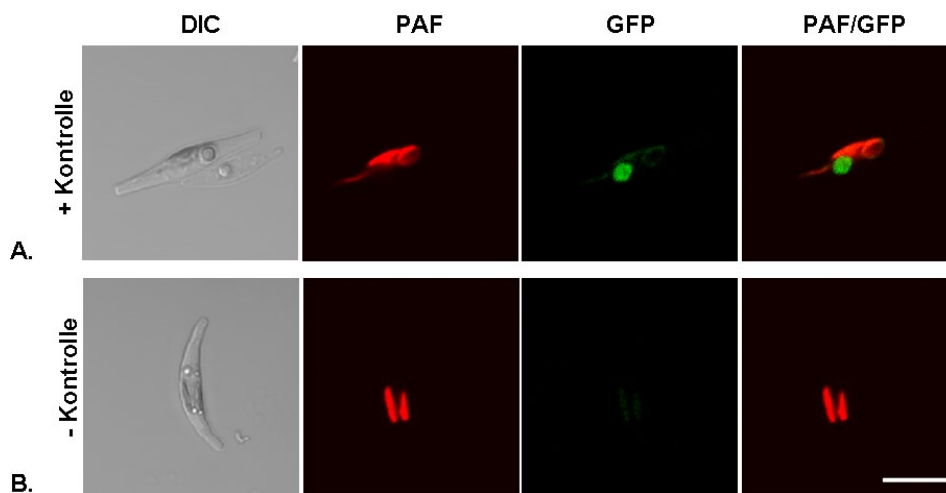
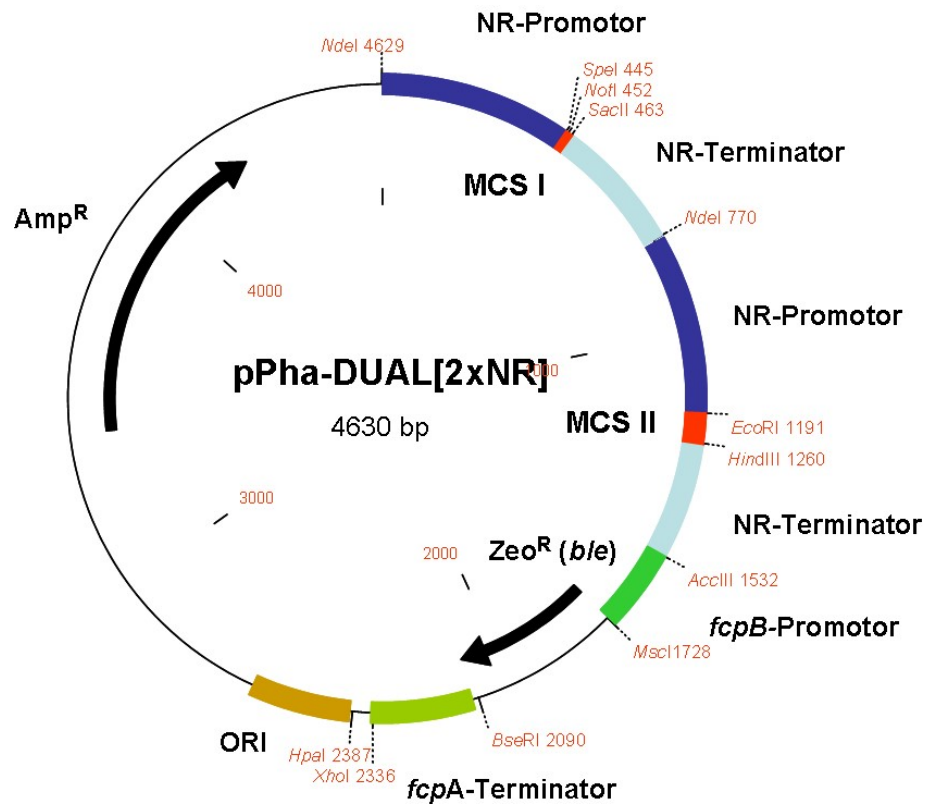


Abb. A-5: Kontrollexperimente zum Split-GFP-Interaktionssystem in *P. tricornutum*. **A.** In der Positiv-Kontrolle wurden die bZIP-Domänen der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun aus Ratte (bFos, bJun) an die Split-GFP-Fragmente N-GFP und C-GFP fusioniert und im heterologen System *P. tricornutum* exprimiert. Beide Fragmente interagieren wie erwartet im Nukleus der Zelle, sichtbar durch GFP-Fluoreszenz. **B.** In der Negativ-Kontrolle wurde ein Konstrukt mit einer Deletion in der bZIP-Domäne des Fos-Proteins ($\Delta 179-193$) eingesetzt. bJun und bFos Δ können nicht interagieren, und es wird wie erwartet keine GFP-Fluoreszenz detektiert. Die Split-GFP Konstrukte wurden nach Hu et al. konstruiert (Hu & Kerppola, 2003). Skala = 10 μ m. PAF – Plastidenautofluoreszenz.

D Tabelle der in Chromalveolaten identifizierten ERAD-Faktoren

Protein	<i>C. merolae</i> CyanoDB	<i>G. theta</i> * NCBI	<i>P. tricornutum</i> PhatrDBv2.0	<i>T. pseudonana</i> ThapsDBv3.0	<i>E. huxleyi</i> * EhuxDBv1.0	<i>P. falciparum</i> PlasmoDBv6.1	<i>T. gondii</i> ToxoDBv5.2
	Wirt	Symbiont	Wirt	Symbiont	Wirt	Symbiont	Wirt
Sec61	CMK192C	AM183806	-	56443	-	442092	59.m00005
BIP	CVT579C	(+)	-	54246	-	PF10875w	583.m00009
Hrd3	(CMG180C)	-	-	39181	-	PF14_0462	(252.m01658)
Hrd1 (E3)	CMG190C	(+)	CAC27064 ^{NM}	49801	-	PF14_0215	540.m00394
Uba1 (E1)	CM1094C	+	54754	54460	268541	262047#	459406
Ubc1 (E2)	-	-	CAC27017 ^{NM}	15966	-	PF13_0301	46.m00017
Ubc4 (E2)	CM152C	-	CAC27113 ^{NM}	22525	34112	22432#	36045#
Ubc6 (E2)	CM5321C	-	-	23065	(56431)	35107	36501#
Ubc7 (E2)	CM5503C	-	-	21310	-	3013	-
Ubi	CMK296C	(+)	-	56440	54323	267126	40668#
Der1-1	CMK163C	-	AAK39810 ^{NM}	46966	31697	6534	9466#
Der1-2	CM1159C	CAK12751	-	37614	35965	10091	17859#
Npl4	CMH273C	-	-	56433	-	2409	-
Ufd1	CMK008C	FJ46591	AAF24006 ^{NM}	44372	49319	16926	22140
Cdc48	CM1023C	FJ464592	AAK39773 ^{NM}	21083	50978	267952	262568
Ufd2	CM5041C	-	-	35755	-	(281597)	-
Png1	CVT048C	-	-	50113	-	(+)	-
Rad23	CMK054C	-	-	43564	-	263031	-
Hsp70	CMPI45C	CA462478	AAK39876 ^{NM}	54019	55890	269120	263422#
						441734	470246
						PF08_0054	59.m00003
						PF10_0114	86.m00361
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76.m03417)
						PFF0940c	645.m00326#
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF08_0067	38.m01076
						PF14_0498	35.m00957
						PF0590c	83.m00015
						PF10_0317	(74.m00447)
						PFE0380c	59.m00041
						PF14_0178	59.m00076
						PF07_0047	59.m03561
						PF08_0020	72.m00386
						PF0810c	59.m00076
						PF14_0178	(76

E Vektorkarten



pPha-DUAL[2xNR] Derivat von pPha-T1 (Acc.Nr.: AF219942)

NR-Promotor:

Intergenische Sequenz 5' des Nitratreduktase-Gens von *P. tricornutum*
(Chromosom 20, 363018-363286)

NR-Terminator:

Intergenische Sequenz 3' des Nitratreduktase-Gens von *P. tricornutum*
(Chromosom 20, 366341-36658)

Abb. A-6: Vektorkarte pPha-DUAL[2xNR].

Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Prof. Dr. Uwe Maier für die interessante Themenstellung und die Bereitstellung der notwendigen Mittel. Meine Arbeit wurde von ihm stets mit großem Interesse verfolgt und gefördert. Zahlreiche Diskussionen und Anregungen haben diese Arbeit begleitet und zu den Ergebnissen beigetragen.

Im Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit sowie Prof. Dr. Andreas Brune und Prof. Dr. Ralf Jacob als weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Der DFG Graduate School 1216 danke ich als assoziiertes Mitglied für die Möglichkeit zur Teilnahme an Workshops, Seminaren und Tagungen.

Der Gruppe von Prof. Dr. Geoff Waldo (Los Alamos, USA) danke ich für die Bereitstellung der Self-assembling GFP-Fragmente GFP1-10 und GFP-11.

Marianne Johannsen und Prof. Dr. Erhard Mörschel möchte ich für die elektronenmikroskopischen Arbeiten danken.

Mein Dank gilt zudem Dr. Stefan Zauner für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie zahlreiche Diskussionen und Hilfestellungen im Labor.

Meiner Schwester Elisabeth und Tassilo Gröper möchte ich für die Hilfe bei Computerproblemen und der Formatierung dieser Arbeit danken.

Bei Andrew bedanke ich mich für das Korrekturlesen verschiedener englischsprachiger Manuskripte sowie für zahlreiche interessante und inspirierende Diskussionen. Topher, Lars und Eike danke ich für die Sequenzierarbeiten am ABI 377.

Der ganzen Arbeitsgruppe Maier danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten	Franziska Hempel geb. am 14.08.1980 in Frankfurt am Main
Promotion 01/2007-12/2009	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie Promotion im Fachgebiet Zellbiologie bei Prof. Dr. Uwe Maier Titel der Dissertation: „SELMA – das ERAD-ähnliche Präproteintranslokationssystem der zweiten Plastidenmembran von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> “
09/2006-01/2007	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie Stipendiatin des Graduiertenkollegs 1216 im Fachgebiet Zellbiologie bei Prof. Dr. Uwe Maier
Hochschulausbildung 11/2005-08/2006	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie Diplomarbeit im Fachgebiet Zellbiologie bei Prof. Dr. Uwe Maier Titel der Diplomarbeit: „Die komplexe Plastide der Cryptomonade <i>Guillardia theta</i> : Untersuchungen zur Lokalisation Nukleus-kodierter Proteine mit zweigeteilten topogenen Signalen und Analyse zur Interaktion von Nukleus- und Nukleomorph-kodierten Proteinen des periplastidären Kompartiments“
10/2001-10/2005	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie Studium der Biologie mit den Hauptfächern Zellbiologie, Parasitologie und Virologie
Schul Ausbildung 1987-1991 1991-1994 1994-1998 Januar-Juni 1999 1999-2001	Besuch der Kurt-Schumacher-Schule in Nidderau Besuch der Augustiner-Schule in Friedberg Besuch der Christian-Wirth-Schule in Usingen Besuch der Lowville Academy and Central School (NY, USA) Besuch der Philipp-Reis-Schule in Friedrichsdorf

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

„SELMA -
das ERAD-ähnliche Präproteintranslokationssystem
der zweiten Plastidenmembran von
Phaeodactylum tricornutum“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 4. November 2009

Franziska Hempel